

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE
Bureau



AG

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU

WO 9603516A1

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :

C12N 15/61, 9/90, 1/21, C12Q 1/68, 1/533

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/03516

(43) Date de publication internationale:

8 février 1996 (08.02.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01001

(22) Date de dépôt international: 26 juillet 1995 (26.07.95)

(30) Données relatives à la priorité:

94/09288

27 juillet 1994 (27.07.94)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BLANCHE, Francis [FR/FR]; 41, rue des Solitaires, F-75019 Paris (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR]; 6, rue Toumefort, F-75005 Paris (FR). CROUZET, Joël [FR/FR]; 48-52, rue des Meuniers, F-75012 Paris (FR). FAMECHON, Alain [FR/FR]; 10, rue Bouray-sur-Juine, F-91510 Janville-sur-Juine (FR). FERRERO, Lucia [IT/FR]; 60, avenue des Gobelins, F-75013 Paris (FR).

(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, Avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).

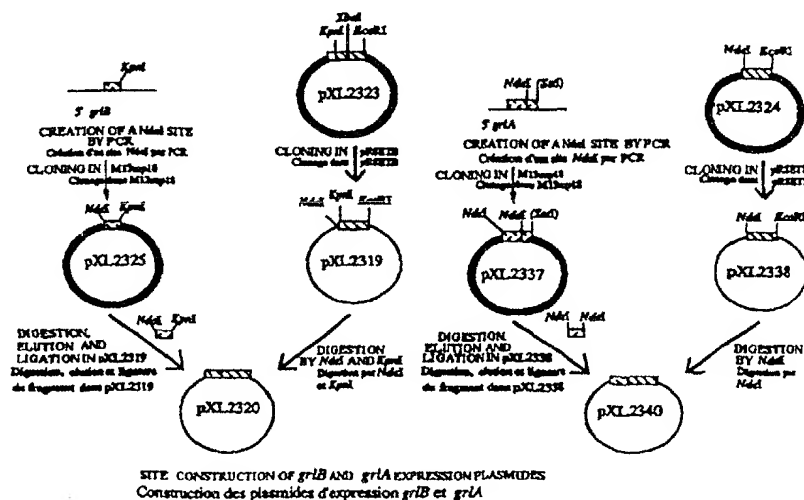
(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: NOVEL TOPOISOMERASE IV, CORRESPONDING NUCLEOTIDE SEQUENCES AND USES THEREOF

(54) Titre: NOUVELLE TOPOISOMERASE IV, SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CORRESPONDANTES ET LEURS UTILISATIONS



(57) Abstract

A novel topoisomerase IV, nucleotide sequences coding for said enzyme, corresponding vectors, and the use of said enzyme for screening biologically active materials.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une nouvelle topoisomérase IV, les séquences nucléotidiques codant pour cette enzyme, leurs vecteurs correspondants et l'utilisation de cette enzyme pour cribler des produits biologiquement actifs.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

NOUVELLE TOPOISOMERASE IV, SEQUENCES NUCLEOTIQUES
CORRESPONDANTES ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne une nouvelle topoisomérase IV, les séquences
nucléotidiques codant pour cette enzyme, leurs vecteurs correspondants et l'utilisation
5 de cette enzyme pour cribler des produits biologiquement actifs.

Les topoisomérases sont des enzymes capables de modifier la configuration
topologique des anneaux de l'ADN, d'y faire des noeuds ou d'enlacer des anneaux
séparés. Elles sont ainsi impliquées dans la réplication, la transcription et la
10 recombinaison de toutes les informations génétiques (Wang et al., 1990). Le
mécanisme de toutes ces conversions topologiques est le même : l'anneau est ouvert
pour qu'un segment d'ADN passe à travers la brèche avant que les extrémités ne se
rejoignent. Deux types de topoisomérases sont impliquées dans ces conversions : les
topoisomérases de type I qui coupent un seul brin d'ADN et les topoisomérases de
15 type II qui coupent simultanément les deux brins.

A ce jour, deux topoisomérases bactériennes de type II, ont été plus
particulièrement identifiées et étudiées, la gyrase d'*Escherichia coli* (Gellert et al.,
1976), et plus récemment, l'ADN topoisomérase IV de *E. coli* (Kato et al., 1990).

20 La gyrase est un tétramère $\alpha_2\beta_2$ dont les sous-unités α ou GyrA et β ou GyrB
sont codées respectivement par les gènes *gyrA* et *gyrB*. Les gyrases bactériennes sont
les seules topoisomérases connues, capables de surenrouler, en présence d'ATP, des
anneaux d'ADN relachés.

En ce qui concerne plus particulièrement, l'ADN topoisomérase IV de *E. coli*,
25 elle relâche l'ADN plasmidique surenroulé, dénoue l'ADN du phage T4 et désenlace
(ou décatène) l'ADN de kinétoplaste (Kato et al., 1992 ; Peng et al., 1993). La
séquence de ses gènes correspondants, *parC* et *parE* de *E. coli*, a permis de mettre en
évidence des régions d'identité élevée entre les sous-unités de la gyrase et celles de
cette topoisomérase IV, respectivement ParC avec GyrA (35,6 % sur toute la
30 séquence) et ParE avec GyrB (40,1 % sur toute la séquence) (Kato et al., 1990).

La gyrase d'*E. coli* a également été identifiée comme étant une cible primaire
des fluoroquinolones (Hooper et al., 1993). Il a ainsi été démontré que des souches
d'*E. coli*, mutées au niveau du résidu Ser83 dans la sous-unité GyrA, présentent une
résistance élevée à l'égard des fluoroquinolones (Maxwell, 1992). Les

fluoroquinolones se lient moins aux complexes ADN-gyrase mutée qu'aux complexes ADN-gyrase sauvage. En fait, d'autres mutations ponctuelles, cartographiées dans la région comprise entre les résidus 67 et 106 de GyrA, conduisent à des souches résistantes aux fluoroquinolones. Cette région est appelée QRDR (Yoshida et al, 1990 ; Cullen et al., 1989). Des résultats comparables ont été publiés avec des souches de Staphylococcus aureus résistantes aux fluoroquinolones (Goswitz et al., 1992; Sreedharan et al., 1990). La gyrase est donc reconnue aujourd'hui comme étant la cible primaire des quinolones. Toutefois, une souche clinique de Staphylococcus aureus, ne comportant aucune mutation dans la région QRDR de GyrA, a également été décrite comme résistante aux fluoroquinolones (Sreedharan et al, 1991).

Aujourd'hui, on se heurte de plus en plus, sur un plan thérapeutique, à ce phénomène de résistance développé par les bactéries Staphylococcus aureus à l'égard des antibiotiques et plus particulièrement vis à vis des fluoroquinolones. Il serait particulièrement important de pouvoir lever cette résistance et ceci passe par une caractérisation de l'ensemble des paramètres qui lui sont associés.

La présente invention a précisément pour principal objectif l'identification, le séquençage et la caractérisation de séquences nucléiques codant pour des sous-unités d'une nouvelle topoisomérase, la topoisomérase IV de Staphylococcus aureus, composée de deux sous-unités la GrlA et la GrlB.

De manière inattendue, la demanderesse a trouvé que la cible primaire des fluoroquinolones chez S. aureus est une topoisomérase IV et non la gyrase. Elle a ainsi mis en évidence que des souches cliniques de S. aureus, dont la région QRDR de la sous-unité GyrA de la gyrase est identique à la séquence sauvage, développent néanmoins une résistance à l'égard des fluoroquinolones en raison d'une mutation qu'elles possèdent dans la région de la sous-unité GrlA de la topoisomérase IV, homologue à la région QRDR.

La présente invention a pour premier objet une séquence nucléotidique codant pour au moins une sous-unité de la topoisomérase IV de Staphylococcus aureus.

La présente invention décrit en particulier l'isolement et la caractérisation des gènes grlA et grlB. Ces gènes ont été clonés, séquencés et exprimés chez E. coli, et leur activité enzymatique a été caractérisée. Ils ont été isolés à partir d'une banque

d'ADN génomique de Staphylococcus aureus. A partir de la séquence nucléique grlAB (SEQ ID N°1), il a été identifié deux phases ouvertes, correspondants respectivement aux gènes grlB et grlA. Les gènes grlA et grlB ont été respectivement séquencés en SEQ ID N°2 et SEQ ID N°3.

5

Préférentiellement, la présente invention a pour objet une séquence nucléotidique choisie parmi:

- (a) tout ou partie des gènes grlA (SEQ ID n° 2) ou grlB (SEQ ID n° 3),
- (b) les séquences hybridant avec tout ou partie des gènes (a) et codant pour
- 10 une sous-unité d'une topoisomérase IV, et
- (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la
- dégénérescence du code génétique.

Il est clair qu'à partir des gènes identifiés dans la présente demande, il est

15 possible, par hybridation, de cloner directement d'autres gènes codant pour une sous-unité de la topoisomérase IV de bactéries proches de S. aureus comme par exemple des Streptocoques et Entérocoques. Il est ainsi possible de cloner ce type de gène en utilisant comme sonde les gènes grlA, grlB ou des fragments de ceux-ci. De même, le clonage de ces gènes peut être réalisé en utilisant des oligonucléotides dégénérés,

20 dérivant des séquences des gènes grlA ou grlB ou de fragments de ceux-ci.

Au sens de la présente invention, on entend par dérivé, toute séquence obtenue par une ou plusieurs modifications et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques de la protéine d'origine. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification de nature

25 génétique et/ou chimique. Ces modifications peuvent être réalisées par les techniques connues de l'homme du métier.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion(s) de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction

30 avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés comportant par rapport à la séquence native un ou plusieurs résidus supplémentaires.

Encore plus préférentiellement, l'invention a pour objet les séquences nucléotidiques représentées par les gènes grlA(SEQ ID N°2) et grlB(SEQ ID N°3).

35

Elle se rapporte également à tout gène grlA possédant une mutation conduisant à une résistance vis-à-vis de molécules de la famille des quinolones et plus particulièrement des fluoroquinolones. A titre représentatif de ces gènes mutés, on peut plus particulièrement citer le gène grlA possédant un changement de base de C en A à la position 2270 de la SEQ ID N°2. Le gène résultant est dit grlA (C-2270A). Cette mutation conduit à une substitution du résidu Ser-80 en Tyr dans la protéine GrlA. La protéine résultante sera désignée par GrlA (Ser-80 Tyr).

Un autre objet de la présente invention concerne un ADN recombinant comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour une sous-unité de la topoisomérase IV de Staphylococcus aureus. Plus préférentiellement, il s'agit d'un ADN recombinant comprenant au moins une séquence nucléotidique telle que définie précédemment en (a), (b) et (c) et plus particulièrement le gène grlA (SEQ ID N°2) grlA (C-2270A) et/ou le gène grlB (SEQ ID N°3).

Selon un mode préféré de l'invention, les séquences nucléotidiques, définies ci-dessus, font partie d'un vecteur d'expression qui peut être à répllication autonome ou intégratif.

Un autre objet de l'invention concerne les polypeptides résultant de l'expression des séquences nucléotidiques telles que définies précédemment. Plus particulièrement, la présente invention concerne les polypeptides comprenant tout ou partie des polypeptides GrlA (SEQ ID N°2) ou GrlB (SEQ ID N°3) ou de leurs dérivés. Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son(s) substrat(s), celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques. Parmi les dérivés résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le terme dérivé comprend également les polypeptides homologues aux polypeptides décrits dans la présente invention, issus d'autres sources cellulaires.

Préférentiellement, il s'agit des polypeptides GrIA (SEQ ID N°2), GrIB (SEQ ID N°3) et GrIA (Ser-80Tyr).

L'invention a également pour objet toute cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique, un ADN recombinant et/ou un vecteur tels que définis ci-avant. Les cellules recombinantes selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, CI27, les oeufs de Xénope, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement Micromonospora, Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp. De préférence, il s'agit de cellules procaryotes. A ce titre on peut plus particulièrement utiliser les bactéries suivantes Actinomycètes, Bacillus, et plus préférentiellement E.coli et Staphylococcus. Les cellules recombinantes de l'invention peuvent être obtenues par toute méthode permettant d'introduire une séquence nucléotidique étrangère dans une cellule. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation de polypeptides tels que revendiqués à partir de la culture d'une de ces cellules recombinantes. Le ou les polypeptides ainsi obtenus, sont récupérés selon des méthodes classiques à l'issue de la culture.

L'invention se rapporte également à une topoisomérase IV isolée, susceptible d'être obtenue à partir de l'expression de tout ou partie du gène grlA (SEQ ID N°2) et de tout ou partie du gène grlB (SEQ ID N°3) ou de leurs dérivés respectifs.

Par dérivé, on entend désigner les séquences hybridant avec tout ou partie du gène grlA ou grlB et codant pour une sous-unité d'une topoisomérase IV ainsi que l'ensemble des séquences dérivant d'une dégénérescence du code génétique de ces séquences hybrides ou des séquences correspondant à tout ou partie du gène grlA ou grlB.

Plus préférentiellement, il s'agit d'une topoisomérase IV isolée, issue de l'expression de tout ou partie du gène grlA (SEQ ID N°2) et de tout ou partie du gène grlB (SEQ ID N°3).

La présente invention concerne plus particulièrement toute topoisomérase IV possédant un comportement de cible primaire à l'égard des fluoroquinolones.

Selon un mode particulier de l'invention, il s'agit de la topoisomérase IV de Staphylococcus aureus.

5 La topoisomérase IV revendiquée selon l'invention, est tout particulièrement utile pour cribler des produits biologiquement actifs comme par exemple des antibiotiques potentiels et notamment des molécules de la famille des fluoroquinolones. Avantageusement, elle peut être également utilisée pour doser et/ou identifier des produits inhibiteurs de la réaction de relaxation ATP dépendante de
10 l'ADN et/ou des produits inhibiteurs de la réaction de décaténation des caténanes d'ADN.

La demanderesse a ainsi mis au point un dosage d'activité enzymatique spécifique de la topoisomérase IV de S. aureus et a montré que cette activité est
15 inhibée par des molécules antibiotiques telles que les fluoroquinolones.

La présente invention propose une nouvelle cible pour rechercher de nouveaux antibiotiques; ainsi qu'un crible spécifique de cette cible, ce crible est décrit dans l'exemple 7. Ce crible permet de mettre en évidence des produits inhibiteurs de l'ADN
20 topoisomérase IV de S. aureus. Dans ce test, pourront être testés : des produits de synthèse purs ou en mélange, des extraits naturels de plantes, des culture de bactéries, de champignons, de levures ou d'algues, purs ou en mélange. Le test décrit dans la présente invention permet de mettre en évidence à la fois des produits qui stabilisent le complexe clivable, intermédiaire réactionnel de la réaction catalysée par l'enzyme mais
25 aussi des inhibiteurs agissant par d'autres mécanismes.

Les exemples et figures, présentés ci-après à titre illustratif et non limitatif, mettent en évidence d'autres avantages et caractéristiques de la présente invention.

30

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Carte de restriction du fragment de 4565 pb contenant les gènes grlB et grlA de S. aureus.

35

Figure 2 : Construction des plasmides d'expression de grlA et grlB. Les constructions réalisées avec grlA sont schématisées en A et celles de grlB sont en B. L'ADN de S. aureus cloné est représenté par les rectangles hachurés, les vecteurs dérivés de M13 sont en ligne noire épaisse et les vecteurs d'expression sont en ligne noire fine, le site de restriction SstI est entre parenthèses car c'est un site de clonage .

Figure 3 : Gel d'électrophorèse PAGE-SDS coloré au bleu de Coomassie. Sont déposés des extraits cellulaires totaux, pistes : 1 et 2, XL1-blue, pXL2340; 3 et 4, XL1-blue, pRSETB; 5 et 6, XL1-blue, pXL2320. Les marqueurs de poids moléculaires (en centaines) sont indiqués à droite de la figure. La flèche montre la protéine surproduite. Les signes + ou - représentent l'induction avec ou sans IPTG.

Figure 4. Activité de relaxation ATP-dépendante de la protéine GrlAB. Les expériences contrôles avec l'ADN topoisomérase IV de E. coli purifiée (Peng and Mariani, 1993) et de l'ADN gyrase de E. coli purifiée (Hallett et al., 1990) sont aussi décrites.

Figure 5. Activité de décaténation de la protéine GrlAB. kDNA, ADN de kinétoplaste; monomères, monomères d'ADN relâchés et décaténés. TopoIV : ADN topoisomérase IV de E. coli purifiée (50 ng) ; Gyrase : ADN gyrase de E. coli purifiée (50 ng) ; GrlA : extrait protéique de GrlA (2 µg) ; GrlB : extrait protéique de GrlB (2 µg) ; GrlAB : extrait protéique de GrlA (2 µg) mélangé avec l'extrait protéique de GrlB (2 µg).

Exemple 1- Amplification par PCR de fragments d'ADN de Staphylococcus aureus internes aux gènes grlA et grlB.

Cet exemple décrit l'obtention de fragments d'ADN de Staphylococcus aureus internes aux gènes grlA et grlB. Ces fragments ont été obtenus après amplification par PCR réalisée à 50°C avec l'ADN génomique de la souche de Staphylococcus aureus RN4220 (Novick, 1990) et des oligonucléotides dégénérés correspondant aux acides aminés conservés dans les régions N-terminales des sous-unités GyrA de E. coli et B. subtilis et ParC de E. coli ou des sous-unités GyrB de E. coli et B. subtilis et ParE

de E. coli. Plus spécifiquement les oligonucléotides sens 2137 et antisens 2135 ont permis d'amplifier des fragments de 255 pb pouvant coder pour 85 acides aminés qui correspondraient aux positions 39 à 124 sur la séquence GyrA de E. coli ; la séquence de l'oligonucléotide sens 2137 est 5'-GCGCGAATTCGATGG (A,T)(C,T)T(A,T)AAACC(A,T)GT(A,T)CA-3' (SEQ ID N°4) et celle de l'antisens 2135 est 5'-CGCGAAGCTTTTC(T,A)GTATA(A,T)C(T,G)CAT (A,T)GC(A,T)GC-3' (SEQ ID N°5). Les oligonucléotides 2144 et 2138 ont conduit à l'amplification de fragments de 1 kb pouvant coder pour 333 acides aminés qui correspondraient aux positions 98 à 430 sur la séquence de GyrB de E. coli ; la séquence de l'oligonucléotide sens 2144 est 5'-GCGCGAATTCT (T,A)CATGC(A,T)GG(T,A)GG(T,A)AAATT-3' (SEQ ID N°6), et celle de l'antisens 2138 est 5'-CGCGAAGCTT(T,A)CC(T,A)CC(T,A)GC(T,A)GAATC(T,A)CCTTC-3' (SEQ ID N°7). Les fragments ont été clonés et un total de 40 clones ont été analysés par séquençage de leur insert. La séquence des oligonucléotides utilisés pour la PCR a été retrouvée pour 31 clones sur 40 ; parmi les 31 clones, 20 possèdent une séquence interne du gène gyrA ou gyrB de S. aureus ; les 11 autres clones contiennent soit un fragment A de 255 bp ou un fragment B de 1 kb.

La séquence en acides aminés que coderait le fragment A a 59% d'identité avec la sous-unité GyrA de S. aureus entre les positions 44 à 125, le fragment A serait donc une partie d'un gène de S. aureus grlA ainsi nouvellement identifié. De même, la séquence en acides aminés que coderait le fragment B a 51% d'identité avec la sous-unité GyrB de S. aureus entre les positions 105 à 277, le fragment B serait donc une partie d'un gène de S. aureus grlB ainsi nouvellement identifié.

25

Exemple 2- Clonage et séquençage des gènes grlA et grlB de Staphylococcus aureus.

Cet exemple décrit les expériences de biologie moléculaire qui ont permis de cloner puis séquencer les gènes grlA et grlB de Staphylococcus aureus.

Les fragments A et B décrits dans l'exemple 1 ont été utilisés comme sonde radioactive pour identifier par hybridation les gènes grlA et grlB dans une banque d'ADN génomique de S. aureus FDA 574 (CE ent⁺) construite dans λ gt11 par Clontech Laboratories (catalogue XL1501b, lot 0721). Sur un total de 250 000 phages recombinants, douze phages hybrident avec le fragment A ou le fragment B

mais n'hybrident pas avec des oligonucléotides spécifiques des gènes gyrA ou gyrB. La taille des inserts EcoRI contenus dans ces phages varie entre 0,7 et 3,5 kb et deux phages 16 et 111 dont l'insert est de plus grande taille, ont été étudiés. L'insert EcoRI de 3,5 kb du phage 16 a été élué puis digéré par XbaI et les deux fragments de 1,5 et 2 kb ont été clonés dans M13mp19 et M13mp18 (Boehringer Mannheim) pour générer pXL2321 et pXL2322. De même l'insert EcoRI de 3,6 kb du phage 111 a été élué puis digéré par PstI et le fragment de 2 kb a été cloné dans M13mp19 pour générer pXL2324.

Les inserts contenus sur les phages recombinants pXL2321, pXL2322 et pXL2324 ont été séquencés sur les deux brins à l'aide du primer universel ou d'oligonucléotides internes en utilisant la méthode de Sanger. La séquence nucléique grlAB (SEQ ID N°1) de 4565 pb, a été analysée par le programme de Staden et al., 1982 pour identifier les séquences codantes à l'aide d'un tableau d'usage des codons chez S. aureus. Deux phases ouvertes uniquement ORF1 (positions 41 à 2029) et ORF2 (positions 2032 à 4431) ont ainsi été déterminées. Sur la SEQ ID N°1, le brin codant est le brin supérieur 5' -> 3', la phase ouverte ORF1 débute arbitrairement à l'ATG position 41 mais elle peut aussi débiter au TTG position 17 ou 35 ce codon étant déjà décrit comme codon d'initiation chez S. aureus ; le codon de terminaison de l'ORF1 se chevauche avec le codon d'initiation GTG de l'ORF2 ce qui est caractéristique d'un couplage traductionnel (Normark et al., 1983); un tel couplage a par exemple été décrit pour les gènes gyrA et gyrB d'Haloferax sp. (Holmes et al., 1991). Ces phases ouvertes ont un pourcentage en GC de 34,5 % qui est une valeur en accord avec les valeurs décrites pour l'ADN de S. aureus dans la littérature (Novick, 1990). D'autre part le fragment B est identique à la séquence décrite sur la SEQ ID N°1 de la position 333 à la position 1348 dans ORF1 et le fragment A est identique à la séquence de la SEQ ID N°1 de la position 2137 à la position 2394 dans ORF2. A partir de la séquence nucléotidique, une carte de restriction est réalisée avec des enzymes qui coupent le moins fréquemment, voir figure 1.

Cette analyse de séquence montre que ORF1 est le gène grlB et ORF2 le gène grlA.

Exemple 3- Structure primaire, expression et fonction des protéines GrIA et GrIB codées par les gènes grlA et grlB de Staphylococcus aureus.

Cet exemple décrit la structure primaire, l'expression chez *E. coli* et la fonction des protéines GrIA et GrIB de *Staphylococcus aureus*. Cette fonction, qui correspond à une ADN topoisomérase IV, repose dans cet exemple sur des données d'homologies de séquence et de complémentation génétique.

5

3.1- Structure primaire et analyse de séquence des protéines GrIA et GrIB.

Cet exemple décrit l'analyse informatique de la séquence des gènes *grlA* et *grlB* de *Staphylococcus aureus*, réalisée à partir des données de séquence présentées dans l'exemple 2. Le gène *grlB* code pour une protéine GrIB de 663 acides aminés (poids moléculaire 74 318) ; et le gène *grlA* code pour une protéine GrIA de 800 acides aminés (poids moléculaire 91 040). Les parties codantes des gènes *grlB* et *grlA*, les séquences des protéines GrIB et GrIA sont présentés respectivement en SEQ ID N°3 et SEQ ID N°2 et les propriétés de chacune de ces protéines (composition en acides aminés, point isoélectrique, index de polarité) figurent dans les tableaux 1 et 2 ci-après.

15

Protéine: GrIA :

Premier résidu = 1 et dernier résidu = 800
20 Masse moléculaire (monoisotopique) = 91040.8438
Masse moléculaire (moyenne) = 91097.2578
Index de polarité (%) = 52.00
Point isoelectrique = 6.77
DO 260 (1mg/ml) = 0.298 DO 280 (1mg/ml) = 0.487

25

			NOMBRE	% NOMB	POIDS	% POIDS
1	Phe	F	22	2.75	3235.51	3.55
2	Leu	L	74	9.25	8368.22	9.19
3	Ile	I	77	9.63	8707.47	9.56
4	Met	M	19	2.38	2489.77	2.73
5	Val	V	59	7.38	5845.04	6.42
6	Ser	S	51	6.38	4438.63	4.88
7	Pro	P	22	2.75	2135.16	2.35
8	Thr	T	43	5.38	4345.05	4.77
9	Ala	A	37	4.63	2628.37	2.89
10	Tyr	Y	28	3.50	4565.77	5.02
12	His	H	20	2.50	2741.18	3.01
13	Gln	Q	26	3.25	3329.52	3.66
14	sn	N	45	5.63	5131.93	5.64
15	Lys	K	66	8.25	8454.27	9.29
16	Asp	D	54	6.75	6211.45	6.82
17	Glu	E	67	8.38	8645.85	9.50
18	Cys	C	0	0.00	0.00	0.00
19	Trp	W	2	0.25	372.16	0.41
20	Arg	R	44	5.50	6868.45	7.54
21	Gly	G	44	5.50	2508.94	2.76

TABLEAU 1

5

Proteine GrIB :

Premier résidu= 1 et dernier résidu = 663

Masse moléculaire (monoisotopique) = 74318.3516

10 Masse moléculaire (moyenne) = 74363.9219

Index de polarité (%) = 53.70

Point isoelectrique = 7.21

DO 260 (1mg/ml) = 0.404 DO 280 (1mg/ml) = 0.603

			NOMBRE	% NOMB	POIDS	% POIDS
1	Phe	F	26	3.92	3823.78	5.15
2	Leu	L	55	8.30	6219.62	8.37
3	Ile	I	36	5.43	4071.03	5.48
4	Met	M	10	1.51	1310.40	1.76
5	Val	V	50	7.54	4953.42	6.67
6	Ser	S	41	6.18	3568.31	4.80
7	Pro	P	15	2.26	1455.79	1.96
8	Thr	T	41	6.18	4142.95	5.57
9	Ala	A	33	4.98	2344.22	3.15
10	Tyr	Y	19	2.87	3098.20	4.17
12	His	H	14	2.11	1918.82	2.58
13	Gln	Q	26	3.92	3329.52	4.48
14	Asn	N	36	5.43	4105.55	5.52
15	Lys	K	63	9.50	8069.98	10.86
16	Asp	D	40	6.03	4601.08	6.19
17	Glu	E	61	9.20	7871.60	10.59
18	Cys	C	0	0.00	0.00	0.00
19	Trp	W	4	0.60	744.32	1.00
20	Arg	R	34	5.13	5307.44	7.14
21	Gly	G	59	8.90	3364.27	4.53

TABLEAU 2

- 5 Le programme de Kanehisa, décrit en 1984, a été utilisé pour aligner les protéines GrlB et GrlA avec les DNA topoisomérases bactériennes de type II suivantes les gyrases de E. coli, B. subtilis ou S. aureus ou la topoisomérase IV de E. coli. Les identités, voir tableau 3, sont élevées et comprises entre 32 et 55%. Plus spécifiquement, GrlB présente plus d'identité avec les sous-unités GyrB de E. coli (49%) et de S. aureus (52%) qu'avec ParE de E. coli (38%) ; alors que GrlA présente des identités comparables avec les sous-unités GyrA de E. coli (32%) et de S. aureus (39%) qu'avec ParE de E. coli (33%).
- 10

- Les sous-unités GyrB de Staphylococcus aureus (Margerrison et al., 1992),
- 15 Bacillus subtilis (Moriya et al., 1985), et Escherichia coli (Adachi et al., 1987) sont nommées SAGYRB, BSGYRB et ECGYRB respectivement, GrlB est nommé SAGRLB et ECPARE correspond à ParE de E. coli (Kato et al., 1990). Une

nomenclature comparable est employée pour les sous-unités GyrA GrlA et ParC. Les chiffres sous le nom des protéines sont les nombres d'acides aminés de celles ci.

Sous-unités B ou B-like	SAGYRB 644	SAGRLB 663	BSGYRB 638	ECGYRB 804
SAGRLB	52 %			
BSGYRB	68 %	55 %		
ECGYRB	55 %	49 %	57 %	
ECPARE	40 %	38 %	40 %	40 %
Sous-unités A ou A-like	SAGYRA 887	SAGRLA 800	BSGYRA 821	ECGYRA 875
SAGRLA	39 %			
BSGYRA	65 %	40 %		
ECGYRA	39 %	32 %	41 %	
ECPARC	38 %	33 %	36 %	32 %

5

TABLEAU 3

Des alignements multiples entre les topoisomérases bactériennes de type II, réalisés avec le programme CLUSTAL de Higgins et al., 1988, mettent en évidence de nombreuses régions conservées entre les séquences des diverses sous-unités B, GrlB et ParE et dans la partie N-terminale de la séquence des sous-unités A, GrlA et ParC. Les résidus conservés dans la région N-terminale des sous-unités B de ces protéines sont en fait les résidus impliqués dans la fixation de l'ATP et identifiés d'après les données de cristallisation aux rayons X avec la GyrB de *E. coli* (Wigley et al., 1991).

Les résidus conservés dans la région N-terminale des sous-unités A de ces protéines sont soit les résidus AAMRYTE (SEQ ID N°8) proches du site actif de la gyrase Tyr-122, identifiée sur la GyrA de *E. coli* (Horowitz et al., 1987) ; ou soit les résidus YHPHGDS, (SEQ ID N°9) modifiés dans les souches résistantes aux fluoroquinolones (Hooper et al., 1993).

20

3.2- Expression des gènes grlA et grlB chez E. coli.

Cet exemple décrit les constructions réalisées pour exprimer, chez E. coli, les gènes grlA ou grlB sous le contrôle du promoteur pT7 (Studier et al., 1990).

- 5 Le plasmide d'expression pXL2320, voir figure 2, contenant le gène grlB dans le vecteur pRSETB (Studier et al., 1990; Invitrogen) a été construit en clonant 1) l'insert EcoRI-XbaI de 1 kb du pXL2321 dans le pXL2322 aux sites XbaI et EcoRI pour générer pXL2323 ; 2) l'insert KpnI-EcoRI de 1,9 kb du pXL2323 aux sites KpnI et EcoRI du vecteur pRSETB pour générer pXL2319 ; l'insert NdeI-KpnI de 0,5 kb du
- 10 pXL2325 aux sites NdeI et KpnI du pXL2319 pour obtenir pXL2320. (Le pXL2325 contient les 500 premières bases du gène où une séquence CAT a été introduite par mutagenèse, juste en amont du codon d'initiation ATG pour créer un site NdeI). La cassette d'expression du gène grlB contenue dans pXL2320 a été clonée aux sites BglII et EcoRI du pKT230 (Bagdasarian et al., 1981) pour obtenir pXL2439.
- 15 Le plasmide d'expression pXL2340, voir figure 2, contenant le gène grlA dans le vecteur pRSETB a été construit en clonant 1) l'insert NdeI-EcoRI de 1,7 kb du pXL2324 aux sites NdeI et EcoRI du vecteur pRSETB pour générer pXL2338 ; l'insert NdeI de 0,75 kb du pXL2337 aux sites NdeI du pXL2338 pour obtenir pXL2340. (Le pXL2337 contient les 750 premières bases du gène où une séquence
- 20 CATATG a été introduite par mutagenèse, à la place du codon d'initiation GTG pour créer un site NdeI).

- Les plasmides pXL2320, ou pXL2340 ont été introduits dans la souche de E. coli XL1-Blue (Stratagen) et l'expression des gènes a été induite lorsque l'ARN polymérase du phage T7 était produite après induction du gène, codant pour l'ARN
- 25 polymérase du phage T7, cloné sur le phage helper M13/T7 (Studier et al., 1990, Invitrogen). Les extraits cellulaires ont été analysés par électrophorèse sur gel PAGE-SDS coloré au bleu de Coomassie comme cela a déjà été décrit (Denéfle et al., 1987). Sur la figure 3 est représentée la production d'une protéine de i) 79 000 de poids moléculaire, lorsque le gène grlB est induit dans la souche E. coli XL1-Blue, pXL2320; et ii) 90 000 de poids moléculaire, lorsque le gène grlA est induit dans la
- 30 souche E. coli XL1-Blue, pXL2340. Les poids moléculaires mesurés sont en accord avec les poids moléculaires déduits de la séquence.

3.3- Complémentation des mutants parCts et parEts de Salmonella typhimurium par les gènes grlA et grlB de Staphylococcus aureus.

Cet exemple décrit la complémentation hétérologue des mutants de S. typhimurium parCts et parEts par les gènes de S. aureus grlA et grlB. Les plasmides pXL2320, pXL2340, pXL2439 ou le vecteur pRSETB ont été introduits dans les souches de S. typhimurium SE7784 (parC281(Ts) zge-2393::Tn10 leu485) ou SE8041 (parE206(Ts) zge-2393::Tn10 leu485) (Luttinger et al., 1991). Aucun plasmide complémente le phénotype thermosensible, par contre lorsque les plasmides pXL2340 et pXL2439 sont introduits simultanément dans la souche SE7784 ou dans la souche SE8041 le phénotype thermosensible des deux souches est complémente. Par conséquent la coexpression des gènes grlA et grlB de S. aureus permet la complémentation du phénotype ParC Ts ou ParE Ts des mutants de S. typhimurium.

15

Exemple 4- L'ADN topoisomérase IV de S. aureus est la cible primaire des fluoroquinolones.

Cet exemple décrit la présence d'une mutation ponctuelle Ser-80 dans la sous-unité GrlA avec toutes les souches cliniques analysées de S. aureus résistantes aux fluoroquinolones alors qu'une mutation dans la région QRDR (Quinolone Determining Region) (équivalente à la région Ser-80 de GrlA) dans la sous-unité GyrA n'existe pas avec les souches cliniques de S. aureus faiblement résistantes aux fluoroquinolones. De ce fait la sous-unité GrlA est montrée être la cible primaire des fluoroquinolones chez S. aureus.

L'ADN génomique de huit souches cliniques de S. aureus et d'une souche de laboratoire a été préparé et utilisé pour amplifier à 42°C par PCR : i) les 500 premières paires de bases de gyrA en utilisant les oligonucléotides sens 5'-GGCGGATCCCATATGGCTGAATTACCTCA-3' (SEQ ID N°10) et antisens 5'-GGCGGAATTCGACGGCTCTCTTTCATTAC-3' (SEQ ID N°11) ; ii) et les 800 premières paires de bases de grlA en utilisant les oligonucléotides sens 5'-GGCCGGATCCCATATGAGTGAAATAATTCAAGATT-3' (SEQ ID N°12) et antisens -5'-GGCCGAATTCTAATAATTAAGTTTACGTCC-3' (SEQ ID N°13). Chaque fragment amplifié a été cloné dans le phage M13mp18 et la séquence des 300 premières paires de bases de chacun des gènes a été lue sur 2 clones. La séquence

- gyrA est identique à celle publiée par Magerrison et celle de griA à celle décrite en SEQ ID N°1, à l'exception des mutations présentées sur le tableau 4. Les mutations dans gyrA existent avec les souches fortement résistantes aux fluoroquinolones (SA4, SA5, SA6, SA35, SA42R et SA47 ; CMI pour la ciprofloxacine > 16 mg/l) ; ces
- 5 mutations sont un changement de base qui conduit aux changements des acides aminés Ser-84 ou Ser-85 ou Glu-88. Une mutation dans griA existe avec toutes les souches résistantes aux fluoroquinolones et correspond au changement du résidu Ser-80 en Phe ou Tyr.

Souche	CMI mg/l Ciprofloxacin	Mutation dans <i>gyrA</i>		Mutation dans <i>griA</i>	
		Base	Codon	Base	Codon
RN4220*	1	non	non	non	non
SA42*	0.5	non	non	non	non
SAH**	2	non	non	2281 G->A	84 ^{Glu->Leu}
SA1**	2	non	non	2270 C->T	80 ^{Ser->Phe}
SAA**	4	non	non	2281 G->A	84 Glu->Lys
SA3**	4	non	non	2270 C->T	80Ser->Phe
SA2**	16	non	non	2270 C->A	80Ser->Tyr
SA47*	16	2533 C->T*	84Ser->Leu	2270 C->A	80Ser->Tyr
SA4**	32	2544 G->A	88Glu->Lys	2270 C->T	80Ser->Phe
SA5**	32	2533 C->T	84 ^{Ser->Leu}	2270 C->T	80 ^{Ser->Phe}
SA6**	32	2533 C->T	84 ^{Ser->Leu}	2270 C->T	80 ^{Ser->Phe}
SA35*	64	2535 T->C	85 ^{Ser->Pro}	2270 C->A	80Ser->Tyr
SA42R*	>128	2533 C->T*	84Ser->Leu	2270 C->A	80Ser->Tyr

TABLEAU 4

* déjà publié par Sreedharan et al. (1990)

5 ** Souches procurées auprès d'Hopitaux Publics Français.

Exemple 5 - Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) du fragment d'ADN de *S. aureus* interne à *grlA* contenant une mutation ponctuelle qui conduit à une substitution dans GrlA de la Ser-80 en Tyr (Ser-80→Tyr).

5 Cet exemple décrit l'obtention du fragment d'ADN interne à *grlA* d'une souche de *S. aureus*, SA2, résistante aux fluoroquinolones. Le fragment de *grlA* contient un changement de base de C en A à la position 2270 du gène sauvage (Fig.1). Cette mutation conduit à une substitution du résidu Ser-80 en Tyr dans la protéine GrlA. Il a été montré qu'une substitution du résidu Ser-80 en Phe ou Tyr existe avec toutes les
10 souches faiblement résistantes aux fluoroquinolones (Exemple 4). Le fragment interne à *grlA* a été obtenu après amplification par PCR réalisée à 50°C avec l'ADN génomique de la souche SA2 et des oligonucléotides 3358 et 3357 qui correspondent respectivement à la position 2036 et 3435 sur la séquence de *grlA*. Plus spécifiquement, les oligonucléotides sens 3358 (SEQ ID N° 12) (Exemple 4) et
15 antisens 3357 ont permis d'amplifier un fragment de 1399 paires de bases; la séquence de l'oligonucléotide antisens 3357 est 5'-GGCCGAGCTCCAATTCTTCTTTTATGACATTC-3' (SEQ ID N°14). L'oligonucléotide 3358 a également été utilisé pour introduire, par mutagenèse, une séquence CATATG, à la place du codon d'initiation GTG pour créer un site *NdeI*. Le
20 fragment de *grlA* amplifié a été cloné dans les sites de clonage *BamHI*/*SstI* de pUC18 (Boehringer Mannheim), et 6 clones contenant ce plasmide, pXL2692, ont été analysés après séquençage de leur insert. Dans tous les cas une séquence CATATG a été introduite à la place du codon d'initiation GTG, et la mutation ponctuelle à la position 2270 de *grlA* (C→A) a été retrouvée.

25

Exemple 6 - Expression chez *E. coli* du gène *grlA* contenant un changement de base correspondant au changement du résidu Ser-80 en Tyr.

Cet exemple décrit la construction réalisée pour exprimer, chez *E. coli*, le gène
30 *grlA* muté sous le contrôle du promoteur T7 (Studier et al., 1990). Le plasmide d'expression pXL2742, contenant le gène *grlA* muté, a été construit en clonant l'insert de 0,75kb du pXL2692 dans le site *NdeI* du pXL2338 (Exemple 3.2). Le plasmide pXL2742 a été introduit dans la souche *E. coli* XL1-Blue et l'expression du gène *grlA* a été réalisé comme cela est décrit dans l'exemple 3.2. La production d'une protéine
35 ayant un poids moléculaire de 90 000 a été obtenue avec le plasmide pXL2742.

contenant le gène grlA. Le poids moléculaire mesuré est en accord avec le poids moléculaire déduit de la séquence du gène grlA, et celui déjà obtenu pour la protéine GrlA sauvage (Exemple 3.2).

5 **Exemple 7- Activité ADN topoisomérase IV de la protéine GrlAB de S. aureus.**

Cet exemple illustre comment un extrait acellulaire contenant la protéine GrlAB peut être préparé et comment l'activité enzymatique de la protéine GrlAB présente dans cet extrait peut être détectée et mesurée.

10

7.1 - Préparation des extraits cellulaires.

Un extrait acellulaire de la souche E. coli XL1-blue pXL2340 exprimant la protéine GrlA est préparé par exemple de la façon suivante:

15 la souche E. coli XL1-blue pXL2340 est cultivée comme suit: 250 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline à 50 mg/l sont inoculés au 1/100ième avec une culture de E. coli XL1-blue pXL2340, et incubés à 30°C; lorsque la densité optique à 600 nm est de 0.3, sont ajoutés 1 mM IPTG; après 30 min d'incubation à 37°C, la souche est infectée par le phage helper M13/T7 avec une multiplicité d'infection de 5 pfu par cellule
20 pendant 4 heures. Après centrifugation (5000 x g; 20 min), les cellules obtenues à partir de 1,5 litre de culture sont resuspendues dans 20 ml de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 contenant 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.12% Brij 58 et 0.75 mg/ml de lysozyme. Après 30 min à 4°C, le mélange est centrifugé durant 1h à 50 000 x g et le surnageant contenant la protéine GrlA est récupéré. Un échange de tampon
25 est effectué sur cet échantillon en chromatographiant l'extrait à travers une colonne remplie de Sephadex G625 (Pharmacia) équilibrée et éluée avec du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5 contenant 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 100 mM NaCl et 10% de saccharose.

Un extrait acellulaire contenant la protéine GrlB est préparé de façon similaire
30 à partir de la souche E. coli XL1-blue pXL2320.

7-2 - Purification de l'ADN topoisomérase IV de S. aureus.

Cet exemple illustre comment une enzyme de S. aureus catalysant la ségrégation des chromosomes fils durant la phase finale de la réplication
35 (topoisomérase IV) peut être purifiée.

La purification des deux sous-unités GrIA et GrIB de la topoisomérase IV est réalisée comme décrit ci-dessous, en utilisant le dosage de l'activité de décaténation décrit dans l'exemple 7.3 pour détecter la présence des protéines GrIA et GrIB tout au long de la purification, ainsi que cela est couramment utilisé par l'homme de l'art. Lors du dosage
5 de cette activité enzymatique, la complémentation des fractions contenant la protéine GrIA est obtenue avec 1 µg de protéines d'un extrait de la souche *E. coli* XL1-blue pXL2320 exprimant la sous-unité GrIB, et la complémentation des fraction contenant la protéine GrIB est obtenue avec 1 µg de protéines d'un extrait de la souche *E. coli* XL1-blue pXL2340 exprimant la sous-unité GrIA. Un mode de préparation privilégié
10 des extraits enzymatiques est décrit dans l'exemple 7.1. Entre chaque étape, les fractions contenant la protéine recherchée sont congelées et conservées à -70°C.

La purification de la sous-unité A peut être effectuée par chromatographie, par exemple en suivant le protocole suivant:

un extrait acellulaire préparé comme décrit à l'exemple 7.1 à partir de 5 g environ de
15 cellules de *E. coli* XL1-blue pXL2340 est chromatographié sur une colonne MonoQ HR 10/10 (Pharmacia) à un débit de 3 ml/min avec un gradient linéaire de NaCl (0,1M à 0,6M en 60 min) dans un tampon pH 8,0 Tris/HCl 10 mM contenant 1 mM EDTA, 1 mM DTT et 10% de glycérol (p/v). Les fractions actives sont regroupées et l'échantillon est chromatographié sur une colonne Superdex 200 HiLoad 26/60
20 (Pharmacia) équilibrée et éluée avec du tampon pH 7,5 Tris/HCl 50 mM contenant 1 mM EDTA, 5 mM DTT et 0,25 M NaCl. La protéine GrIA, qui se présente sous forme d'un pic symétrique, est co-éluee avec l'activité recherchée. Après cette étape, la préparation présente une seule bande visible en SDS-PAGE après révélation au nitrate d'argent, et cette bande migre avec un poids moléculaire apparent de 90 000 environ.

25 La purification de la sous-unité B peut être effectuée par chromatographie, par exemple en suivant le protocole suivant:

un extrait acellulaire préparé comme décrit à l'exemple 5 à partir de 5 g environ de
cellules de *E. coli* XL1-blue pXL2320 est injecté sur une colonne de Novobiocine-
30 Sepharose CL-6B (6 ml de gel préparé suivant le protocole décrit par Staudenbauer et al., 1981, Nucleic Acids Research) équilibrée dans du tampon pH 7,5 Tris/HCl 50 mM contenant 1 mM EDTA, 5 mM DTT et 0,3 M NaCl. Après lavage de la colonne avec le même tampon, la protéine GrIB est éluée avec du tampon pH 7,5 Tris/HCl 50 mM contenant 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 M NaCl et 5 M urée. Cette fraction est ensuite

chromatographiée sur une colonne de perméation de gel Superdex 200 HiLoad 26/60 (Pharmacia) équilibrée et éluée avec du tampon pH 7,5 Tris/HCl 50 mM contenant 1 mM EDTA, 5 mM DTT et 0,25 M NaCl. La protéine GrIB, qui se présente sous forme d'un pic symétrique, est co-éluee avec l'activité recherchée. Après cette étape, la
5 préparation présente une seule bande visible en SDS-PAGE après révélation au nitrate d'argent, et cette bande migre avec un poids moléculaire apparent de 80 000 environ.

7.3 Détection des activités enzymatiques de la protéine GrLAB.

10 Les différentes activités enzymatiques de la protéine GrLAB sont détectées en incubant dans le même mélange réactionnel des quantités égales des deux types d'extraits préparés à l'aide du procédé décrit ci dessus ou de tout autre procédé permettant de récupérer les protéines enzymatiques intracellulaires du microorganisme tout en préservant leur activité, comme par exemple les procédés mettant en oeuvre
15 l'utilisation de presses (telles que la French Press, la X-Press), ou l'utilisation des ultrasons.

On peut détecter l'activité de relaxation (ou relâchement) ATP-dépendante de l'ADN surenroulé en procédant par exemple de la façon suivante:

20 un mélange d'un extrait de la souche *E. coli* XL1-blue pXL2320 (1 µg de protéines) et d'un extrait de la souche *E. coli* XL1-blue pXL2340 (1 µg de protéines) est incubé durant 1h à 37°C dans 30 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.7 contenant 4 mM ATP, 6 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM spermidine, 20 mM KCl, 50 µg/ml d'albumine de sérum de boeuf et 500 ng de plasmide pBR322 surenroulé. La réaction est arrêtée
25 par l'ajout de 7 µl d'un mélange SDS à 5% et protéinase K à 2,5 mg/ml et les échantillons sont incubés pendant une seconde période de 30 min à 37°C puis analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% dans du tampon Tris/borate 0.1M pH 8.3 contenant 2 mM EDTA à 6V/cm pendant 3h. La séparation des ADN relâchés et nickés (ou open circular) est effectuée en procédant à une migration électrophorétique
30 supplémentaire de 2h après ajout de bromure d'éthidium (1 µg/ml) au tampon de migration. L'ADN est ensuite quantifié en scannant les négatifs de photos des gels (film Polaroid type 665) à l'aide d'un appareil Bioimage 50S (Millipore).

La Figure 4 montre que les extraits acellulaires des souches *E. coli* XL1-blue pXL2320 et *E. coli* XL1-blue pXL2340 présentent en mélange, une intense activité de
35 relâchement de l'ADN alors que chacun des extraits est inactif lorsqu'il est incubé seul.

La réaction est dépendante de l'ATP. De plus, ces deux extraits, seuls ou en mélange ne présentent pas d'activité de surenroulement de l'ADN, activité typique de la gyrase.

On peut détecter l'activité de décaténation ATP-dépendante de molécules d'ADN circulaires entrelacées (caténanes) en procédant par exemple de la façon suivante :

un mélange d'un extrait de la souche *E. coli* XL1-blue pXL2320 (2.5µg de protéines) et d'un extrait de la souche *E. coli* XL1-blue pXL2340 (2.5µg de protéines) est incubé durant 1h à 37°C dans 40µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.7 contenant 1 mM ATP, 6 mM MgCl₂, 200mM de glutamate, 10 mM DTT, 10 mM NaCl, 50 µg/ml d'albumine de sérum de boeuf et 800 ng d'ADN de kinetoplaste [constitué d'un réseau de molécules d'ADN enlacées (caténanes) obtenu à partir de *Crithidia fasciculata*; TopoGene]. La réaction est arrêtée par l'ajout de 7µl d'une solution 250 mM EDTA (incubation 5 min à 37°C), 5 µl d'un mélange SDS à 5% et protéinase K à 2,5 mg/ml (incubation 30 min à 37°C). Le mélange est ensuite analysé par électrophorèse en gel d'agarose à 1% dans du tampon Tris/borate 0.1M pH 8.3 contenant 2 mM EDTA à 6V/cm pendant 2h 30 min. Après coloration de l'ADN au bromure d'éthidium (1µg/ml), l'ADN est quantifié en scannant les négatifs de photos des gels (film Polaroid type 665) à l'aide d'un appareil Bioimage 50S (Millipore). En se plaçant par exemple dans les conditions décrites ci dessus, les extraits des deux souches *E. coli* XL1-blue pXL2320 et *E. coli* XL1-blue pXL2340 présentent en mélange une activité de décaténation complète de l'ADN de kinétoplaste de départ. Cette activité est mise en évidence par l'apparition d'une bande d'ADN d'une taille de 2,5 kb environ et par la disparition de la bande d'ADN caténé de très grosse taille qui pénètre très peu dans le gel au cours de la migration électrophorétique (Figure 5). La gyrase de *E. coli* introduite en contrôle dans cet essai ne présente pas d'activité de décaténation contrairement à l'ADN topoisomérase IV de *E. coli* qui décatène complètement l'ADN de kinétoplaste (Figure 5).

Exemple 8 - Activité ADN topoisomérase IV de la protéine GrlAB de *S. aureus* dont la sous-unité GrlA présente une substitution du résidu Ser-80 en Tyr (Ser-80→Tyr).

8.1- Préparation d'un extrait cellulaire contenant la protéine GrlAB de S. aureus dont la sous-unité GrlA présente une substitution du résidu Ser-80 en Tyr (Ser-80→Tyr).

Cet exemple illustre comment un extrait acellulaire contenant la protéine GrlA(Ser-80→Tyr)B peut être préparé, et comment l'activité enzymatique de la protéine GrlA(Ser-80→Tyr)B peut être détectée et mesurée.

Un extrait acellulaire de la souche E. coli XL1-Blue pXL2742 exprimant la protéine GrlA(Ser-80→Tyr) est préparé par exemple comme décrit à l'exemple 7 pour la protéine GrlA sauvage.

8.2 - Purification d'une l'ADN topoisomérase IV de S. aureus possédant une mutation Ser-80-Tyr dans la sous-unité GrlA.

Cet exemple illustre comment une topoisomérase IV de S. aureus possédant une mutation Ser-80→Tyr dans la sous-unité GrlA peut être purifiée. La sous-unité GrlA de la topoisomérase IV possédant une mutation Ser-80→Tyr est purifiée en suivant un protocole identique à celui décrit à l'exemple 7.2 à partir d'une culture de la souche E. coli XL1-blue pXL2742 construite comme décrit à l'exemple 6.

8.3 - Détection des activités enzymatiques.

Les activités ATP-dépendantes de relaxation de l'ADN surenroulé d'une part, et de décaténation de molécules d'ADN circulaire entrelacées d'autre part, sont mises en évidence dans cet extrait comme cela est décrit à l'exemple 7, en incubant dans le même mélange réactionnel, un extrait acellulaire de la souche E. coli XL1-Blue pXL2742 contenant la protéine GrlA(Ser-80→Tyr) et un extrait de la souche E. coli XL1-Blue pXL2320 contenant la protéine GrlB.

Exemple 9. Inhibition par les fluoroquinolones de l'activité ADN topoisomérase IV de la protéine GrlAB sauvage de S. aureus et résistance aux fluoroquinolones de la protéine comportant une transition Ser-80→Tyr dans la sous-unité GrlA.

Les deux méthodes décrites dans l'exemple 7 pour le dosage d'activités ADN topoisomérase IV peuvent être utilisées pour mettre en évidence de nouvelles molécules agissant comme des inhibiteurs de la topoisomérase IV de *S. aureus* ou pour caractériser le comportement de la topoisomérase IV de *S. aureus* vis-à-vis de
5 molécules déjà identifiées comme inhibitrices d'autres topoisomérases (par exemple les fluoroquinolones).

Dans le test de relaxation de l'ADN surenroulé par exemple, la disparition ou la diminution de la bande d'ADN relâché lors de l'analyse du mélange réactionnel après incubation de la protéine GrIAB de *S. aureus* en présence d'une molécule ou d'un
10 mélange de plusieurs molécules, indique que cette molécule (ou ces molécules) est inhibitrice de l'activité de relaxation de GrIAB, et est donc potentiellement antibactérienne.

Toutefois, puisque les études réalisées à ce jour (décrites dans l'exemple 7) ont démontré que la protéine GrIAB est une topoisomérase IV, et puisqu'il est aujourd'hui
15 établi que la fonction majeure des topoisomérases IV est la décaténation (ou désenchevêtrement) des chromosomes fils enlacés lors des étapes finale de la réplication, il paraît plus judicieux de rechercher les inhibiteurs de la protéine GrIAB en utilisant un test de décaténation de l'ADN en mettant en oeuvre, par exemple, le
20 test décrit à l'exemple 7.3. Pour réaliser les expériences décrites dans les exemples qui suivent, les incubations sont effectuées avec la protéines GrIAB sauvage purifiée comme décrit à l'exemple 7, et avec la protéine GrIA(Ser-80→Tyr)B mutante comme décrit à l'exemple 8. Les deux protéines GrIAB sauvage et mutante sont reconstituées en mélangeant des quantités équimolaires de leurs deux sous-unités GrIA et GrIB.

Dans le test de décaténation, s'il est observé la disparition ou la diminution de
25 l'intensité de la bande d'ADN décaténé lors de l'analyse du mélange réactionnel après incubation de la protéine GrIAB en présence d'une molécule ou d'un mélange de plusieurs molécules, ceci indique que cette molécule (ou ces molécules) est inhibitrice de l'activité de décaténation de la protéine GrIAB, et est donc potentiellement antibactérienne.

Puisqu'il a été démontré dans la présente invention que la protéine GrIAB est la cible
30 primaire pour les molécules de la famille des fluoroquinolones, il apparaît que les fluoroquinolones doivent agir comme des inhibiteurs dans le test de décaténation décrit à l'exemple 7. En effet, lorsque la protéine GrIAB purifiée est incubée en présence de quantités croissantes d'une fluoroquinolone, par exemple la
35 ciprofloxacine, il apparaît qu'à partir d'une concentration de 10 µg/ml, la

ciprofloxacin inhibe totalement l'activité de décaténation de l'ADN de kinétoplaste. La ciprofloxacin inhibe 50% de l'activité de décaténation de l'ADN de kinétoplaste à une concentration de 4,0 µg/ml.

De même, la sparfloxacine qui est une autre fluoroquinolone, inhibe 50% de l'activité de décaténation de l'ADN de kinétoplaste à une concentration de 6,0 µg/ml.

De même, puisqu'il a été démontré dans la présente invention (exemple 4) que la présence d'une mutation Ser-80→Tyr sur la sous-unité GrlA de la protéine GrlAB mutante confère à la souche un certain niveau de résistance aux fluoroquinolones, par exemple la ciprofloxacin, il apparaît que les fluoroquinolones doivent agir sur cette ADN topoisomérase IV mutante comme des inhibiteurs moins efficaces dans le test de décaténation décrit à l'exemple 7.

En effet, lorsque la protéine GrlA(Ser-80→Tyr)B mutante est incubée en présence de quantités croissantes d'une fluoroquinolone, par exemple la ciprofloxacin, il apparaît que la ciprofloxacin inhibe 50% de l'activité de décaténation de l'ADN de kinétoplaste à une concentration de 60 µg/ml, soit une concentration 15 fois supérieure à celle nécessaire pour obtenir le même effet avec l'enzyme sauvage.

De même, en présence de l'enzyme GrlA(Ser-80→Tyr)B mutante, la sparfloxacine inhibe 50% de l'activité de décaténation de l'ADN de kinétoplaste à une concentration de 500 µg/ml, soit une concentration 80 fois supérieure à celle nécessaire pour obtenir le même effet avec l'enzyme sauvage.

La norfloxacine inhibe 50% de l'activité de décaténation de l'ADN de kinétoplaste à une concentration de 12 µg/ml avec l'enzyme GrlAB sauvage et présente la même activité inhibitrice à une concentration de 125 µg/ml avec l'enzyme GrlA(Ser-80→Tyr)B.

L'ofloxacine inhibe 50% de l'activité de décaténation de l'ADN de kinétoplaste à une concentration de 10 µg/ml avec l'enzyme GrlAB sauvage et présente la même activité inhibitrice à une concentration de 250 µg/ml avec l'enzyme GrlA(Ser-80→Tyr)B.

La novobiocine, dont le mécanisme d'action est différent de celui des fluoroquinolones, doit donc en principe présenter la même activité inhibitrice sur les deux enzymes GrlAB sauvage et GrlA(Ser-80→Tyr)B mutante dans le test de décaténation décrit dans l'exemple 7. En effet, la novobiocine inhibe 50% de l'activité de décaténation de l'ADN de kinétoplaste à une concentration de 30 µg/ml environ quelque soit l'enzyme utilisée (GrlAB sauvage ou GrlA(Ser-80→Tyr)B mutante).

ABREVIATIONS

- ADN : acide déoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
5 CMI : concentration minimale inhibitrice
IPTG : isopropylthio- β -D-galactoside
LB : milieu Luria-Bertani
PAGE : gel d'électrophorèse contenant de l'acrylamide et du N,N'-méthylènebisacrylamide
PCR : réaction de polymérisation de chaîne
10 pfu : particule conduisant à la formation d'une plaque
QRDR : région de la sous-unité GyrA où sont cartographiées les mutations
ponctuelles conduisant à la résistance aux fluoroquinolones
SDS : sodium dodecyl sulfate
Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane

REFERENCES

- Adachi, T., Mizuuchi, M., Robinson, E.A., Apella, E., O'Dea, M.H., Gellert, M., and Mizuuchi K. (1987) DNA sequence of the *E. coli gyrB* gene: application of a new sequencing strategy. *Nucl Acid Res* **15**: 771-784.
- 5 Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C., Bagdasarian, M.M., Frey, J., and Timmis, K. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
- 10 Colman, S.D., Hu, P.C., and Bott, K.F. (1990) *Mycoplasma pneumoniae* DNA gyrase genes. *Mol Microbiol* **4**: 1129-11134.
- Cullen, M.E., Wyke, A.W., Kuroda, R., and Fisher, L.M. (1989) Cloning and characterization of a DNA gyrase gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 886-894.
- 15 Denèfle P., Kovarik, S., Guiton, J.D., Cartwright, T., and Mayaux, J.-F. (1987) Chemical synthesis of a gene coding for human angiogenin, its expression in *Escherichia coli* and conversion of the product into its active form. *Gene* **56**: 61-70.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., and Nash, H.A. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 3872-3876.
- 20 Goswitz, J.J., Willard, K.E., Fasching, C.E., and Peterson, L.R. (1992) Detection of *gyrA* gene mutations associated with ciprofloxacin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: analysis by polymerase chain reaction and automated direct DNA sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1166-1169.
- 25 Higgins, D.G., and Sharp, P.M. (1988) Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**: 237-244.
- Holmes, M.L., and Dyll-Smith, M. (1991) Mutations in the DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaeobacteria. *J Bacteriol* **173**: 642-648.
- 30 Hooper, D.C., Wolfson, J.S. (1993) Mechanisms of quinolone action and bacterial killing. In *Quinolone Antimicrobial Agents*. Hooper, D.C., Wolfson, J.S. (eds) Washington: American Society of Microbiology, pp.53-75.
- Horowitz, D.S., and Wang, J.C. (1987) Mapping of the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. *J Biol Chem* **262**: 5339-5344.
- 35

- Huang, W.M. (1992) Multiple DNA gyrase-like genes in Eubacteria. In *Molecular Biology of DNA Topoisomerases and its Application to Chemotherapy*. Andoh, T., Ikeda, H., and Oguro, M. (eds). London: CRC Press, pp. 39-48.
- Kanehisa M. (1984) Use of statistical criteria for screening potential homologies in
5 nucleic acids sequences. *Nucl Acids Res* 12: 203-215.
- Kato, J., Suzuki, H., and Ikeda, H. (1992) Purification and characterization of DNA topoisomerase-IV in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267: 25676-25684.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Higara, S., and Suzuki, H. (1990)
10 New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63: 393-404.
- Luttinger, A. L., Springer, A.L., and Schmid, M.B. (1991) A cluster of genes that affects nucleoid segregation in *Salmonella typhimurium*. *New Biol* 3: 687-697.
- Margerrison, E.E.C., Hopewell, R., and L.M. Fisher. (1992) Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus* *gyrB-gyrA* locus encoding the DNA gyrase A and
15 B proteins. *J Bacteriol* 174: 1596-1603.
- Maxwell, A. (1992) The molecular basis of quinolone action. *J. Antimicrob. Chemother.* 330: 409-416.
- Moriya, S., Ogasawara, N. and Yoshida, H. (1985) Structure and function of the region of the replication origin of *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide
20 sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. *Nucl Acid Res* 13: 2251-2265.
- Normark S., Bergström, S., Edlund, T., Grundström, T., Jaurin, B., Lindberg, F., and Olsson, O. (1983) Overlapping genes. *Ann Rev Genet* 17: 499-525.
- Novick, R.P. (1990) The staphylococcus as a molecular genetic system. In
25 *Molecular Biology of the Staphylococci*. Novick, R.P. (ed). New York: VCH Publishers, pp. 1-37.
- Parales, R. E., and Harwood, C. S. (1990) Nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Pseudomonas putida*. *Nucl Acid Res* 18: 5880-5880.
- Peng, H., Marians, K.J. (1993 (a)) *Escherichia coli* topoisomerase IV Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem* 268:
30 24481-24490.
- Peng, H., Marians, K.J. (1993 (b)) Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8571-8575.

- Sambrook J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 5 Sreedharan, S., Peterson, L., and Fisher, L.M. (1991) Ciprofloxacin-resistance in coagulase-positive and -negative Staphylococci: role of mutations at serine 84 in the DNA gyrase A protein of *Staphylococcus aureus*: and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 2151-2154.
- 10 Sreedharan, S., Oram, M., Jensen, B., Peterson, L., and Fisher, L.M. (1990) DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 7260-7262.
- Staden, R., and McLachlan, A.D. (1982) Codon preference and its use in identifying protein coding regions in long DNA sequences. *Nucl Acid Res* **10**: 141-156.
- 15 Staudenbauer, W. L., and Orr, E. (1981) DNA gyrase: affinity chromatography on novobiocin-Sepharose and catalytic properties *Nucleic Acids Research* **9**: 3589-3603
- Stein, D.C., Danaher, R.J., and Cook, T.M. (1991) Characterization of a *gyrB* mutation responsible for low-level nalidixic acid resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 622-626.
- 20 Studier, W. F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Duberndorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 89-60.
- Swamberg, S.L., and Wang, J.C. (1987) Cloning and sequencing of the *Escherichia coli* DNA *gyrA* gene coding for the A subunit of DNA gyrase. *J Mol Biol* **197**: 729-736.
- 25 Thiara, A.M., and Cundliffe, E. (1993) Expression and analysis of two *gyrB* genes from the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. *Mol Microbiol* **8**: 495-506.
- 30 Wang, J.C., and Liu, L.F. (1990) DNA replication: topological aspects and the roles of DNA topoisomerases. In *DNA Topology and its Biological Effects*. Cozzarelli, N.R., and Wang J.C. (eds). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.321-340.
- 35 Wang, Y., Huang, W.M., and Taylor, D.E. (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* *gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents and Chemother* **37**: 457-463.

- Wigley, D.B., Davies, G.J., Dodson, E. J., Maxwell, A., and Dodson, G. (1991)
Crystal structure of an NH₂-terminal fragment of the DNA gyrase B protein.
Nature **351**: 624-629.
- 5 Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., and Nakamura, S. (1990) Quinolone
resistance determining region in the DNA gyrase gene of *Escherichia coli*.
Antimicrob Agents Chemother **34**: 1271-1272.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

- 5 (i) DEPOSANT:
(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
(C) VILLE: ANTONY
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92165
- 10 (ii) TITRE DE L' INVENTION :NOUVELLE TOPOISOMERASE IV,
SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CORRESPONDANTES ET UTILISATIONS.
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 14
- (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
15 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 4565 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 25 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Staphylococcus aureus
- 30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

10 20 30 40 50 60
35 GAATTCGAC GTACGTTTGC AGGAGGCGAA ATCATTGGCA ATGAATAAAC AAAATAATTA
CTTAAGGCTG CATGCAAACG TCCTCCGCTT TAGTAACCGT TACTTATTG TTTTATTAAT

70 80 90 100 110 120
TTCAGATGAT TCAATACAGG TTTTAGAGGG GTTAGAAGCA GTTCGTAAAA GACCTGGTAT
AAGTCTACTA AGTTATGTCC AAAATCTCCC CAATCTTCGT CAAGCATTTT CTGGACCATA

40 130 140 150 160 170 180
GTATATTGGA TCAACTGATA AACGGGGATT ACATCATCTA GTATATGAAA TTGTCGATAA
CATATAACCT AGTTGACTAT TTGCCCTAA TGTAGTAGAT CATATACTTT AACAGCTATT

190 200 210 220 230 240
 CTCCGTCGAT GAAGTATTGA ATGGTTACGG TAACGAAATA GATGTAACAA TTAATAAAGA
 GAGGCAGCTA CTTCATAACT TACCAATGCC ATTGCTTTAT CTACATTGTT AATTATTTCT

5 250 260 270 280 290 300
 TGGTAGTATT TCTATAGAAG ATAATGGACG TGGTATGCCA ACAGGTATAC ATAAATCAGG
 ACCATCATAA AGATATCTTC TATTACCTGC ACCATACGGT TGTCCATATG TATTTAGTCC

10 310 320 330 340 350 360
 TAAACCGACA GTCGAAGTTA TCTTTACTGT TTTACATGCA GGAGGTAAAT TTGGACAAGG
 ATTTGGCTGT CAGCTTCAAT AGAAATGACA AAATGTACGT CCTCCATTTA AACCTGTTCC

15 370 380 390 400 410 420
 TGGCTATAAA ACTTCAGGTG GTCTTCACGG CGTTGGTGCT TCAGTGGTAA ATGCATTGAG
 ACCGATATTT TGAAGTCCAC CAGAAGTGCC GCAACCACGA AGTCACCATT TACGTAATC

20 430 440 450 460 470 480
 TGAATGGCTT GAAGTTGAAA TCCATCGAGA TGGTAATATA TATCATCAAA GTTTTAAAAA
 ACTTACCGAA CTTCAACTTT AGGTAGCTCT ACCATTATAT ATAGTAGTTT CAAAATTTTT

25 490 500 510 520 530 540
 CGGTGGTTCG CCATCTTCAG GTTTAGTGAA AAAAGGTAAA ACTAAGAAAA CAGGTACCAA
 GCCACCAAGC GGTAGAAGTC CAAATCACTT TTTTCCATTT TGATCTTTTT GTCCATGGTT

30 550 560 570 580 590 600
 AGTAACATTT AAACCTGATG ACACAATTTT TAAAGCATCT ACATCATTTA ATTTTGATGT
 TCATTGTAAA TTTGACTAC TGTGTTAAAA ATTTCGTAGA TGTAGTAAAT TAAACTACA

35 610 620 630 640 650 660
 TTTAAGTGAA CGACTACAAG AGTCTGCGTT CTTATTGAAA AATTTAAAAA TAACGCTTAA
 AAATTCATTT GCTGATGTTT TCAGACGCAA GAATAACTTT TTAAATTTTT ATTGCGAATT

40 670 680 690 700 710 720
 TGATTTACGC AGTGGTAAAG AGCGTCAAGA GCATTACCAT TATGAAGAAG GAATCAAAGA
 ACTAAATGCG TCACCATTTT TCGCAGTTCT CGTAATGGTA ATACTTCTTC CTTAGTTTCT

45 730 740 750 760 770 780
 GTTTGTTAGT TATGTCAATG AAGGAAAAGA AGTTTTCAT GACGTGGCTA CATTTTCAGG
 CAAACAATCA ATACAGTTAC TTCCTTTTCT TCAAAACGTA CTGCACCGAT GTAAAAGTCC

50 790 800 810 820 830 840
 TGAAGCAAAT GGTATAGAGG TAGACGTAGC TTTCCAATAT AATGATCAAT ATTCAGAAAG
 ACTTCGTTTA CCATATCTCC ATCTGCATCG AAAGGTTATA TTACTAGTTA TAAGTCTTTC

55 850 860 870 880 890 900
 TATTTTAAGT TTTGTAAATA ATGTACGTAC TAAAGATGGT GGTACACATG AAGTTGGTTT
 ATAAAATTCA AAACATTTAT TACATGCATG ATTTCTACCA CCATGTGTAC TTCAACCAAA

910 920 930 940 950 960
 TAAAACAGCA ATGACACGCG TATTTAATGA TTATGCACGT CGTATTAATG AACTTAAAC
 ATTTTGTCGT TACTGTGCGC ATAAATTACT AATACGTGCA GCATAATTAC TTGAATTTTG

970 980 990 1000 1010 1020
 AAAAGATAAA AACTTAGATG GTAATGATAT TCGTGAAGGT TTAACAGCTG TTGTGTCTGT
 TTTTCTATTT TTGAATCTAC CATTACTATA AGCACTTCCA AATTGTCGAC AACACAGACA

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TCGTATTCCA GAAGAATTAT TGCAATTTGA AGGACAAACG AAATCTAAAT TGGGTACTTC
 AGCATAAGGT CTTCTTAATA ACGTTAACT TCCTGTTTGC TTTAGATTTA ACCCATGAAG

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 TGAAGCTAGA AGTGCTGTTG ATTCAGTTGT TGCAGACAAA TTGCCATTCT ATTTAGAAGA
 5 ACTTCGATCT TCACGACAAC TAAGTCAACA ACCTCTGTTT AACGGTAAGA TAAATCTTCT
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AAAAGGACAA TTGTCTAAAT CACTTGTGAA AAAAGCGATT AAAGCACAAC AAGCAAGGGA
 TTTTCCTGTT AACAGATTTA GTGAACACTT TTTTCGCTAA TTTCGTGTTG TTCGTTCCCT
 10 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AGCTGCACGT AAAGCTCGTG AAGATGCTCG TTCAGGTAAG AAAACAAGC GTAAAGACAC
 TCGACGTGCA TTTTCGAGCAC TTCTACGAGC AAGTCCATTG TTTTGTTCG CATTTCTGTG
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 15 TTTGCTATCT GGTAAATTAA CACCTGCACA AAGTAAAAAC ACTGAAAAAA ATGAATTGTA
 AAACGATAGA CCATTTAATT GTGGACGTGT TTCATTTTGT TGACTTTTTT TACTTAACAT
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 20 TTTAGTCGAA GGTGATTCTG CGGGAGGTTT AGCAAAACTT GGACGAGACC GCAAATTCCA
 AAATCAGCTT CCACTAAGAC GCCCTCCAAG TCGTTTGTAA CCTGCTCTGG CGTTTAAGGT
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 25 AGCGATATTA CCATTACGTG GTAAGGTAAT TAATACAGAG AAAGCACGTC TAGAAGATAT
 TCGCTATAAT GGTAATGCAC CATTCCATTA ATTATGTCTC TTTTCGTGCAG ATCTTCTATA
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TTTTAAAAAT GAAGAAATTA ATACAATTAT CCACACAATC GGGGCAGGCG TTGGTACTGA
 AAAATTTTTT CTTCTTTAAT TATGTTAATA GGTGTGTTAG CCCCCTCCGC AACCATGACT
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 30 CTTTAAATTT GAAGATAGTA ATTATAATCG TGTAATTATT ATGACTGATG CTGATACTGA
 GAAATTTTAA CTTCTATCAT TAATATTAGC ACATTAATAA TACTGACTAC GACTATGACT
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 35 TGGTGCGCAT ATTCAGTGC TATTGTTAAC ATTCTTCTTC AAATATATGA AACCGCTTGT
 ACCACGCGTA TAAGTTCACG ATAACAATTG TAAGAAGAAG TTTATATACT TTGGCGAACA
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 40 TCAAGCAGGT CGTGATTTTA TTGCTTTACC TCCACTTTAT AAATTGGAAA AAGGTAAAGG
 AGTTCGTCCA GCACATAAAT AACGAAATGG AGGTGAAATA TTAAACCTTT TTCCATTTC
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 45 CAAAACAAAG CGAGTTGAAT ACGCTTGGAC AGACGAAGAG CTTAATAAAT TGCAAAAAGA
 GTTTTGTTC GCTCAACTTA TGCGAACCTG TCTGCTTCTC GAATTATTTA ACGTTTTTCT
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 ACTTGGTAAA GGCTTCACGT TACAACGTTA CAAAGGTTTG GGTGAAATGA ACCCTGAACA
 TGAACCATTT CCGAAGTGCA ATGTTGCAAT GTTTCCAAAC CCACTTTACT TGGGACTTGT
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 50 ATTATGGGAA ACGACGATGA ACCCAGAAAC ACGAACTTTA ATTCGTGTAC AAGTTGAAGA
 TAATACCCTT TGCTGCTACT TGGGTCTTTG TGCTTGAAAT TAAGCACATG TTCAACTTCT
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 55 TGAAGTGCCT TCATCTAAAC GTGTAACAAC ATTAATGGGT GACAAAGTAC AACCTAGACG
 ACTTCACGCA AGTAGATTTG CACATTGTTG TAATTACCCA CTGTTTCATG TTGGATCTGC

	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	TGAATGGATT	GAAAAGCATG	TTGAGTTTGG	TATGCAAGAG	GACCAAAGTA	TTTAGATAAA
	ACTTACCTAA	CTTTTCGTAC	AACTCAAACC	ATACGTTCTC	CTGGTTTCAT	AAAATCTATT
5	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	TTCTGAAGTA	CAAGTGCTTG	AAAATGATCA	ATTTGATGAG	GAGGAAATCT	AGTGAGTGAA
	AAGACTTCAT	GTTCCAGAAC	TTTTACTAGT	TAACTACTC	CTCCTTTAGA	TCACTCACTT
10	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	ATAATTCAAG	ATTTATCACT	TGAAGATGTT	TTAGGTGATC	GCTTTGGAAG	ATATAGTAAA
	TATTAAGTTC	TAAATAGTGA	ACTTCTACAA	AATCCACTAG	CGAAACCTTC	TATATCATTT
15	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	TATATTATTG	AAGAGCGTGC	ATTGCCAGAT	GTTTCGTGATG	GTTTAAACC	AGTACAACGT
	ATATAATAAG	TTCTCGCAGG	TAACGGTCTA	CAAGCACTAC	CAAATTTTGG	TCATGTTGCA
20	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	CGTATTTTAT	ACGCAATGTA	TTCAAGTGGT	AATACACACG	ATAAAAAATT	CCGTAAAAGT
	GCATAAAATA	TGCGTTACAT	AAGTTCACCA	TTATGTGTGC	TATTTTAA	GGCATTTTCA
25	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	GCGAAAACAG	TCGGTGATGT	TATTGGTCAA	TATCATCCAC	ATGGAGACTC	CTCAGTGTAC
	CGCTTTTGTC	AGCCACTACA	ATAACCAGTT	ATAGTAGGTG	TACCTCTGAG	GAGTCACATG
30	2290	2300	2310	2320	2330	2340
	GAAGCAATGG	TCCGTTTAAG	TCAAGACTGG	AAGTTACGAC	ATGTCTTAAT	AGAAATGCAT
	CTTCGTTACC	AGGCAAATTC	AGTTCTGACC	TTCAATGCTG	TACAGAATTA	TCTTTACGTA
35	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	GGTAATAATG	GTAGTATCGA	TAATGATCCG	CCAGCGGCAA	TGCGTTACAC	TGAAGCTAAG
	CCATTATTAC	CATCATAGCT	ATTACTAGGC	GGTCGCCGTT	ACGCAATGTG	ACTTCGATTG
40	2410	2420	2430	2440	2450	2460
	TTAAGCTTAC	TAGCTGAAGA	GTTATTACGT	GATATTAATA	AAGAGACAGT	TTCTTTTCATT
	AATTCGAATG	ATCGACTTCT	CAATAATGCA	CTATAATTAT	TTCTCTGTCA	AAGAAAGTAA
45	2470	2480	2490	2500	2510	2520
	CCAAACTATG	ATGATACGAC	ACTCGAACCA	ATGGTATTGC	CATCAAGATT	TCCTAACTTA
	GGTTTGATAC	TACTATGCTG	TGAGCTTGGT	TACCATAACG	GTAGTTCTAA	AGGATTGAAT
50	2530	2540	2550	2560	2570	2580
	CTAGTGAATG	GTTCTACAGG	TATATCTGCA	GGTTACGCGA	CAGATATACC	ACCACATAAT
	GATCACTTAC	CAAGATGTCC	ATATAGACGT	CCAATGCGCT	GTCTATATGG	TGGTGTATTA
55	2590	2600	2610	2620	2630	2640
	TTAGCTGAAG	TGATTCAAGC	AACACTTAAA	TATATTGATA	ATCCGGATAT	TACAGTCAAT
	AATCGACTTC	ACTAAGTTCC	TTGTGAATTT	ATATAACTAT	TAGGCCTATA	ATGTCAGTTA
60	2650	2660	2670	2680	2690	2700
	CAATTAATGA	AATATATTAA	AGGTCCTGAT	TTTCCAACGT	GTGGTATTAT	TCAAGGTATT
	GTTAATTACT	TTATATAATT	TCCAGGACTA	AAAGGTTGAC	CACCATAATA	AGTTCCATAA
65	2710	2720	2730	2740	2750	2760
	GATGGTATTA	AAAAAGCTTA	TGAATCAGGT	AAAGGTAGAA	TTATAGTTCC	TTCTAAAGTT
	CTACCATAAT	TTTTTCGAAT	ACTTAGTCCA	TTTCCATCTT	AATATCAAGC	AAGATTTCAA
70	2770	2780	2790	2800	2810	2820
	GAAGAAGAAA	CTTTACGCAA	TGGACGTAAA	CAGTAATTA	TTACTGAAAT	TCCATATGAA
	CTTCTTCTTT	GAAATGCGTT	ACCTGCATTT	GTCAATTAAT	AATGACTTTA	AGGTATACTT

5 2830 2840 2850 2860 2870 2880
GTGAACAAAG GTAGCTTAGT AAAACGTATC GATGAATTAC GTGCTGACAA AAAAGTCGAT
CACTTGTTTC CATCGAATCA TTTTGCATAG CTA CTTAATG CACGACTGTT TTTTCAGCTA

10 2890 2900 2910 2920 2930 2940
GGTATCGTTG AAGTACGTGA TGAAACTGAT AGAACTGGTT TACGAATAGC AATTGAATTG
CCATAGCAAC TTCATGCACT ACTTTGACTA TCTTGACCAA ATGCTTATCG TTA CTTA C

15 2950 2960 2970 2980 2990 3000
AAAAAAGATG TGAACAGTGA ATCAATCAAA AATTATCTTT ATAAAAACTC TGATTTACAG
TTTTTCTAC ACTTGTCAC TTAGTTAGTTT TTAATAGAAA TATTTTGTAG ACTAAATGTC

20 3010 3020 3030 3040 3050 3060
ATTTCAATATA ATTTCAACAT GGTGCTATT AGTGATGGTC GTCCAAATT GATGGGTATT
TAAAGTATAT TAAAGTTGTA CCAGCGATAA TCACTACCAG CAGGTTTAA CTACCCATAA

25 3070 3080 3090 3100 3110 3120
CGTCAAAATA TAGATAGTTA TTTGAATCAT CAAATTGAGG TTGTTGCAAA TAGAACGAAG
GCAGTTTAAT ATCTATCAAT AA CTTAGTA GTTAACTCC AACAACGTTT ATCTTGCTTC

30 3130 3140 3150 3160 3170 3180
TTTGAATTAG ATAATGCTGA AAAACGTATG CATATCGTTG AAGGTTTGAT TAAAGCGTTG
AACTTAATC TATTACGACT TTTTGCATAC GTATAGCAAC TTCCAAACTA ATTTGCGAAC

35 3190 3200 3210 3220 3230 3240
TCAATTTTAG ATAAAGTAAT CGAATTGATT CGTAGCTCTA AAAACAAGCG TGACGCTAAA
AGTTAAAATC TATTTTATTA GCTTAACTAA GCATCGAGAT TTTTGTTCGC ACTGCGATTT

40 3250 3260 3270 3280 3290 3300
GAAAACCTTA TCGAAGTATA CGAGTTCACA GAAGAACAGG CTGAAGCAAT TGTAATGTTA
CTTTTGGAAAT AGCTTCATAT GCTCAAGTGT CTTCTTGTC GACTTCGTTA ACATTACAAT

45 3310 3320 3330 3340 3350 3360
CAGTTATATC GTTTAACAAA CACTGACATA GTTGCGCTTG AAGGTGAACA TAAAGAACTT
GTCAATATAG CAAATTGTTT GTGACTGTAT CAACGCGAAC TTCCACTTGT ATTTCTTGAA

50 3370 3380 3390 3400 3410 3420
GAAGCATTA TCAAACAATT ACGTCATATT CTTGATAACC ATGATGCATT ATTGAATGTC
CTTCGTAATT AGTTTGTTAA TGCAGTATAA GAACTATTGG TACTACGTAA TAACTTACAG

55 3430 3440 3450 3460 3470 3480
ATAAAAGAAG AATTGAATGA AATTAAAAAG AAATTCAAT CTGAACGACT GTCTTTAATT
TATTTCTTC TTA CTTACT TTAATTTTTC TTTAAGTTTA GACTTGCTGA CAGAAATTA

3490 3500 3510 3520 3530 3540
GAAGCAGAAA TTGAAGAAAT TAAAATTGAC AAAGAAGTTA TGGTGCCTAG TGAAGAAGTT
CTTCGTCTTT AACTTCTTTA ATTTTAACTG TTTCTTCAAT ACCACGGATC ACTTCTTCAA

3550 3560 3570 3580 3590 3600
ATTTTAAGTA TGACACGTCA TGGATATATT AAACGTACTT CTATTCGTAG CTTTAATGCT
TAA AATTCAT ACTGTGCAGT ACCTATATAA TTTGCATGAA GATAAGCATC GAAATTACGA

3610 3620 3630 3640 3650 3660
AGCGGTGTTG AAGATATTGG TTTAAAAGAT GGTGACAGTT TACTTAAACA TCAAGAAGTA
TCGCCACAAC TTCTATAACC AAATTTTCTA CCACTGTCAA ATGAATTTGT AGTTCTTCAT

3670 3680 3690 3700 3710 3720
 AATACGCAAG ATACCGTACT AGTATTTACA AATAAAGGTC GTTATCTATT TATACCAAGTT
 5 TTATGCGTTC TATGGCATGA TCATAAATGT TTATTTCCAG CAATAGATAA ATATGGTCAA
 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 CATAAATTAC GAGATATTCTG TTGGAAAGAA TTGGGGCAAC ATGTATCACA AATAGTTTCCT
 GTATTTAATG CTCTATAAGC AACCTTTCTT AACCCCGTTG TACATAGTGT TTATCAAGGA
 10 3790 3800 3810 3820 3830 3840
 ATCGAAGAAG ATGAAGTGGT TATTAATGTC TATAATGAAA AGGACTTTAA TACTGATGCA
 TAGCTTCTTC TACTTCACCA ATAATTACAG ATATTACTTT TCCTGAAATT ATGACTACGT
 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 15 TTTTATGTTT TTGCGACTCA AAATGGCATG ATTAAGAAAA GTACAGTGCC TCTATTTAAA
 AAAATACAAA AACGCTGAGT TTTACCGTAC TAATTCTTTT CATGTCACGG AGATAAATTT
 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 20 ACAACGCGTT TTAATAAACC TTTAATTGCA ACTAAAGTTA AAGAAAATGA TGATTTGATT
 TGTTCGCAA AATTATTTGG AAATTAACGT TGATTTCAAT TTCTTTTACT ACTAACTAA
 3970 3980 3990 4000 4010 4020
 25 AGTGTATATGC GCTTTGAAAA AGATCAATTA ATTACCGTAA TTACAAATAA AGGTATGTCA
 TCACAATACG CGAAACTTTT TCTAGTTAAT TAATGGCATT AATGTTTATT TCCATACAGT
 4030 4040 4050 4060 4070 4080
 TTAACGTATA ATACAAGTGA ACTATCAGAT ACTGGATTAA GGGCGGCTGG TGTTAAATCA
 AATTGCATAT TATGTTCACT TGATAGTCTA TGACCTAATT CCCGCCGACC ACAATTTAGT
 4090 4100 4110 4120 4130 4140
 30 ATAAATCTTA AAGTTGAAGA TTTGCTTGTT ATGACAGAAG GTGTTTCTGA AAATGATACT
 TATTTAGAAT TTCAACTTCT AAAGCAACAA TACTGTCTTC CACAAAGACT TTTACTATGA
 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 35 ATATTGATGG CCACACAACG CGGCTCGTTA AAACGTATTA GTTTTAAAAAT CTTACAAGTT
 TATAACTACC GGTGTGTTGC GCCGAGCAAT TTTGCATAAT CAAAATTTTA GAATGTTCAA
 4210 4220 4230 4240 4250 4260
 40 GCTAAAAGAG CACAACGTGG AATAACTTTA TTAAAAGAAT TAAAGAAAAA TCCACATCGT
 CGATTTTCTC GTGTTGCACC TTATTGAAAT AATTTTCTTA ATTTCTTTT AGGTGTAGCA
 4270 4280 4290 4300 4310 4320
 45 ATAGTAGCTG CACATGTAGT GACAGGTGAA CATAGTCAAT ATACATTATA TTCAAAATCA
 TATCATCGAC GTGTACATCA CTGTCCACTT GTATCAGTTA TATGTAATAT AAGTTTTAGT
 4330 4340 4350 4360 4370 4380
 AACGAAGAAC ATGGTTTAAT TAATGATATT CATAAATCTG AACAATATAC AAATGGCTCA
 TTGCTTCTTG TACCAAATTA ATTACTATAA GTATTTAGAC TTGTTATATG TTTACCGAGT
 4390 4400 4410 4420 4430 4440
 50 TTCATTGTAG ATACAGATGA TTTTGGTGAA GTAATAGACA TGTATATTAG CTAAAAACTA
 AAGTAACATC TATGTCTACT AAAACCACTT CATTATCTGT ACATATAATC GATTTTTGAT
 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 55 TATGCAATCA CGAAATTAAA TGATAAAATA CAGTAATGTT AAATTTTGAC TAAATTCAG
 ATACGTTAGT GCTTTAATTT ACTATTTTAT GTCATTACAA TTTAAACTG ATTTAAGTTC

4510 4520 4530 4540 4550 4560
GGATTTATAT TAAATGCTGA CCAAGTACTT ATCGTTAAAT TAGCGATACG GAATCCGCGG
CCTAAATATA ATTTACGACT GGTTCATGAA TAGCAATTTA ATCGCTATGC CTTAGGCGCC

AATTC
TTAAG

10 (3) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 2402 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Staphylococcus aureus

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

25 M S E I I Q D L S L E D V L G D R E G R Y S K Y I
GTGAGTGAAATAATTCAAGATTTATCACTTGAAGATGTTTTAGGTGATCGCTTTGGAAGATATAGTAAATATATT
2032 2042 2052 2062 2072 2082 2092 2102

30 I Q E R A L P D V R D G L K P V Q R R I L Y A M Y
ATTCAGAGCGTGCAATTGCCAGATGTTTCGTGATGGTTTAAACAGTACAACGTCGTATTTTATACGCAATGTAT
2107 2117 2127 2137 2147 2157 2167 2177

35 S S G N T H D K N F R K S A K T V G D V I G Q Y H
TCAAGTGGTAATACACAGGATAAAATTTCCGTAAAAGTGCGAAAACAGTCGGTGATGTTATTGGTCAATATCAT
2182 2192 2202 2212 2222 2232 2242 2252

40 P H G D S S V Y E A M V R L S Q D W K L R H V L I
CCACATGGAGACTCCTCAGTGTACGAAGCAATGGTCCGTTTAAAGTCAAGACTGGAAGTTACGACATGTCTTAATA
2257 2267 2277 2287 2297 2307 2317 2327

45 E M H G N N G S I D N D P F A A M R Y T E A K L S
GAAATGCATGGTAATAATGGTAGTATCGATAATGATCCGCCAGCGGCAATGCGTTACACTGAAGCTAAGTTAAGC
2332 2342 2352 2362 2372 2382 2392 2402

50 L L A E E L L R D I N K E T V S F I F N Y D D T T
TTACTAGCTGAAGAGTTATTACGTGATATTAATAAAGAGACAGTTCTTTTCATTCCAAACTATGATGATACGACA
2407 2417 2427 2437 2447 2457 2467 2477

55 L E F M V L F S R F F N L L V K G S T G I S A G Y
CTCGAACCAATGGTATTGCCATCAAGATTTCTTAAGTACTAGTGAATGGTTCTACAGGTATATCTGCAGGTTAC
2482 2492 2502 2512 2522 2532 2542 2552

A T C I P F H N L A E V I Q A T L M Y I D N F D I
GCGACAGATATACCACACATAATTAGGTGAAGTGATTCAGCAACACTTAAATATATTGATAATCCGGATATT
2557 2567 2577 2587 2597 2607 2617 2627

T V N Q L M F I I K G F F F I T 3 3 I I Q G I D G
ACASTCAATCAATTAAATGAAATATATTAAAGGTCCTGATTTTCAACTGCTGATTATTCAAGGTATTGATGGT
2631 2641 2651 2662 2671 2681 2691 2702

5 I K K A Y E S G K G R I I V R 3 F V E E E T L R N
ATTAAAAAGCTTATGAATCAGGTAAAGGTAGAATTATAGTTGGTTCTAAAGTTGAAGAAGAACTTTACGCAAT
2707 2717 2727 2737 2747 2757 2767 2777

10 G R Y Q L I I T E I P Y E V N K G S L V K R I D E
GGACGTAAACAGTTAATTATTACTGAAATCCATATGAAGTGAACAAAGGTAGCTTAGTAAACGTATCGATGAA
2782 2792 2802 2812 2822 2831 2842 2852

15 L R A D K K V D G I V E V R D E T D R T G L R I A
TTACGTGCTGACAAAAAGTCGATGGTATCGTTGAAGTACGTGATGAAACTGATAGAACTGGTTTACGAATAGCA
2857 2867 2877 2887 2897 2907 2917 2927

20 I E L K K D V N S E S I K N Y L Y K N S D L Q I S
ATTGAATTGAAAAAGATGTGAACAGTGAATCAATCAAAATATCTTTATAAAACTCTGATTACAGATTTCAT
2932 2942 2952 2962 2972 2982 2992 3002

Y N F N M V A I S D G R P K L M G I R Q I I D S Y
TATAATTTCAACATGGTCGCTATTAGTGATGGTCGTCCAAATGATGGGTATTCGTCAAATTATAGATAGTTAT
3007 3017 3027 3037 3047 3057 3067 3077

25 L N H Q I E V V A N R T K F E L D N A E K R M H I
TTGAATCATCAATTTGAGGTTGTTGCAATAGAACGAAGTTTGAATTAGATAATGCTGAAAAAGGTATCGATATC
3082 3092 3102 3112 3122 3132 3142 3152

30 V E G L I K A L S I L D K V I E L I R S S K N K R
GTTGAAGGTTTGATTAAAGCGTTGTCATTTTAGATAAAGTAATCGAATTGATTCGTAGCTCTAAAAAGCGGT
3157 3167 3177 3187 3197 3207 3217 3227

D A K E N L I E V Y E F T E E Q A E A I V M L Q L
GACGCTAAAGAAAACCTTATCGAAGTATACGAGTTTACAGAGAAGCAGGCTGAAGCAATTGTAATGTTACAGTTA
3232 3242 3252 3262 3272 3282 3292 3302

35 Y R L T N T D I V A L E G E H K E L E A L I K Q I
TATCGTTTAAACAACTGACATAGTTGCGCTTGAAGGTGAACATAAAGAACTTGAAGCATTAAATCAAAACATTA
3307 3317 3327 3337 3347 3357 3367 3377

40 R H I L D N H D A L L N V I K E E L N E I K K K F
CGTCATATTTCTGATAACCATGATGCATTATTGAATGTCATAAAGAAGAATTGAATGAATTTAAAGAAATTC
3382 3392 3402 3412 3422 3432 3442 3452

45 K S E R L S L I E A E I E E I K I D K E V M V P S
AAATCTGAAGCACTGCTTTAATTGAAGCAGAAATGAAGAAATTAATTTGACAAAGAAGTTATGGTGCCTAGT
3457 3467 3477 3487 3497 3507 3517 3527

50 E E V I L S M T R H G Y I K R T S I R S F N A S G
GAAGAAGTTATTTTAAAGTATGACACGTCATGGATATATTAAACGTACTTCTATTCTAGCTTTAATGCTAGCGGT
3532 3542 3552 3562 3572 3582 3592 3602

55 V E D I G L K D G D S L L K H Q E V N T Q D T V L
GTTGAAGATATTGGTTTAAAGATGGTGACAGTTTACTTAAACATCAAGAAGTAATACGCAAGATACCGTACTA
3607 3617 3627 3637 3647 3657 3667 3677

60 V F T N K G R Y L F I F V H K L R E I R W K E L G
GTATTACAAATAAAGTTCGTTATCTATTATACCAGTTTCATAAATTACGAGATATTCGTTGGAAAGAAATGGGG
3682 3692 3702 3712 3722 3732 3742 3752

Q H V S Q I V F I E E D E V V I N V Y N E K D F N
CAACATGATACAAATATCTCTATCGAAGAAGATGAAGTGGTTATTAAATGCTATAATGAAAGGACTTTAAT
3757 3767 3777 3787 3797 3807 3817 3827

65 T D A F Y V F A T Q N G M I K H S T V F L F K T T
ACTGATGCATTTTATGTTTTTTCGACTCAAAATGGGATGATTAAGAAAGTACAATGCTCTATTATAAACAACG
3832 3842 3852 3862 3872 3882 3892 3902

70 R F N K E L I A T K V K E N D D L I S V M R F E K
CGTTTTAATAAAGCTTTAATTGCAACTAAAGTTAAAGAAATGATGATTTGATTAGTTATGCGCTTTGAAAA
3907 3917 3927 3937 3947 3957 3967 3977

D Q L I T V I T L F G H S L T Y A T S E L S D T G
 3982 3992 4002 4012 4022 4032 4042 4052
 5 L R A A G V K S I N L H V E E F V V M T E G V S E
 TTAAGGGCGGCTGGTGTAAATCAATAAATCTTAAAGTTGAAGATTTGGTTGTATGACAGAAGGTGTTTCTTA
 4057 4067 4077 4087 4097 4107 4117 4127
 10 N D T I L M A T Q R G S L K R I S F K I L O V A K
 AATGATACTATATTGATGGCCACACACGCGGCTCGTTAAACGTATTAGTTTAAATCTTACAAGTTGCTAAA
 4132 4142 4152 4162 4172 4182 4192 4202
 15 R A Q R G I T L L K E L K K N F H R I V A A H V V
 AGAGCACAACGTGGAATAACTTTATTTAAAGAATTAAAGAAAAATCCACATCGTATAGTAGCTGCACATGTAGTG
 4207 4217 4227 4237 4247 4257 4267 4277
 20 T G E H S Q Y T L Y S K S N E E H G L I N D I H K
 ACAGGTGAACATAGTCAATATACATTATTTCAAATCAAACGAAGACATGGTTTAATTAATGATATTCATAAA
 4282 4292 4302 4312 4322 4332 4342 4352
 S E Q Y T N G S F I V D T D D F G E V I D M Y I S
 TCTGAACAATATACAAATGGCTCATTGATGATACAGATGATTTTGTGAAGTAATAGACATGTATATTAGC
 4357 4367 4377 4387 4397 4407 4417 4427
 25 ...
 TAA
 4432

(4) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1991 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
 (iii) ANTI-SENS: NON
 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Staphylococcus aureus

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

M N K Q N N Y S D D S I Q V L E G L E A V R K R P
 45 41 51 61 71 81 91 101 111
 ATGAATAAACAAATATTATTAGATGATTCATACAGGTTTGTAGAGGAGTTCGTAAGAGACCT
 G M Y I G S T C K R G L H H L V Y E E V D N S V D
 116 126 136 146 156 166 176 186
 GGTATGTATATTGGATCAACTGATAAACGGGGATTACATCATCTAGTATATGAAATTGTGATAAATCCGTCGAT
 50 E V L N G Y G N E I D V T I N F E G S I S I E D N
 GAAGTATTGAATGGTTACGGTAACGAAATAGATGTAACAATTAATAAAGATGTATATTCTATAGAAGATAAT
 191 201 211 221 231 241 251 261
 55 G R G M P T G I H K S G K E T V E V I F T V L H A
 GGACGTTGGTATGCCAAGGTATACATAAATCAGSTAAACCGACAGTCCAGTTATCTTTACTGTTTACATGCA
 266 276 286 296 306 316 326 336

Q G H F D L G E Y H T S G G L H G V G A S V V N A
341 351 361 371 381 391 401 411
5 L S E W L E V E I H R D G N I Y H Q S F H N G G S
416 426 436 446 456 466 476 486
10 P S S G L V K H G K T K K T G T K V T F K P D D T
491 501 511 521 531 541 551 561
15 I F K A S T S F N F D V L S E R L Q E S A F L L K
566 576 586 596 606 616 626 636
20 N L K I T L N D L R S G K E R Q E H Y H Y E E G I
641 651 661 671 681 691 701 711
K E F V S Y V N E G K E V L H D V A T F S G E A N
716 726 736 746 756 766 776 786
25 G I E V D V A F Q Y N D Q Y S E S I L S F V N N V
791 801 811 821 831 841 851 861
30 R T K D G G T H E V G F K T A M T R V F N D Y A R
866 876 886 896 906 916 926 936
35 R I N E L K T H D K N L D G N D I R E G L T A V V
941 951 961 971 981 991 1001 1011
S V R I E E E L L Q F E G Q T K S K L G T S E A R
1016 1026 1036 1046 1056 1066 1076 1086
40 S A V D S V V A D K L P F Y L E E K G Q L S K S L
1091 1101 1111 1121 1131 1141 1151 1161
45 V K K A I K A Q Q A R E A A R K A R E D A R S G K
1166 1176 1186 1196 1206 1216 1226 1236
50 K N K R K D T L L S G K L T P A Q S K N T E K N E
1241 1251 1261 1271 1281 1291 1301 1311
L Y L V E G D S A G G S A K L G R D R K F Q A I L
1316 1326 1336 1346 1356 1366 1376 1386
55 P L R G K V I N T E K A R L E E I F K N E E I N T
1391 1401 1411 1421 1431 1441 1451 1461
60 I I H T I G A S V G T D F K I E D S N Y N R V I I
1466 1476 1486 1496 1506 1516 1526 1536
65 M T D A C T C S A H I Q V L L L T F F F H Y M K F
1541 1551 1561 1571 1581 1591 1601 1611
70 L V Q A G R V F I A L P P L Y K L E F S K G K T K
1616 1626 1636 1646 1656 1666 1676 1686

R V E Y A W T C E E L N K L C H E L S K G F T L Q
 CGAGTTGAATACGCTTGGACAGACGAAGAGCTTAATAAATTGCAAAAAGAAATTTGGTAAAGGCTTCACGTTACAA
 1691 1701 1711 1721 1731 1741 1751 1761
 5 R Y K G L G E M N F E Q L W E T T M N F E T R T L
 CGTTACAAAGSTTTGGGTGAAATGAACCGTGAACAATTATGGGAAACGACGATGAACCCAGAAACACGAACTTTA
 1766 1776 1786 1796 1806 1816 1826 1836
 10 I R V Q V E D E V R S S K R V T T L M G D K V Q F
 ATTCGTGTACAAGTTGAAGATGAAGTGCCTTCATCTAAACSTGTAACAACATTATGGGTGACAAAGTACAACCT
 1841 1851 1861 1871 1881 1891 1901 1911
 15 R R E W I E K H V E F G M Q E D Q S I L D N S E V
 AGACGTGAATGGATTGAAAAGCATGTTGAGTTTGGTATGCAAGAGGACCAGTATTTAGATAATTCTGAAGTA
 1916 1926 1936 1946 1956 1966 1976 1986
 Q V L E N D Q F D E E E I ***
 CAAGTGCTTGAAAATGATCAATTTGATGAGGAGGAAATCTAG
 1991 2001 2011 2021
 20

(5) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

35

GCGCGAATTC GATGGWYTW AACCWGTWCA

30

40 (6) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 31 bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

45

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

5 CGCGAAGCTT TTCWGTATAW CKCATWGCWG C 31

(7) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 29 bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

20 GCGCGAATTC TWCATGCWGG WGGWAAATT 29

25

(8) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

35 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

40 CGCGAAGCTT WCCWCCWGCW GAATCWCCTT C 31

(9) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 7 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

10

Ala Ala Met Arg Tyr Thr Glu

15

5

(10) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 7 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

25

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

30

Tyr His Pro His Gly Asp Ser

5

35 (11) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

- 40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 29 bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

5 GGCGGATCCC ATATGGCTGA ATTACCTCA

29

(12) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

20

GGCGGAATTC GACGGCTCTC TTTCATTAC

29

25

(13) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

40

GGCCGGATCC CATATGAGTG AAATAATTCA AGATT

35

(14) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 32 bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

10 (iii) ANTI-SENS: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

15 GGCCGAATTC TAATAATTAA CTGTTTACGT CC

32

(15) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 32 bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

25 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

30 GGCCGAGCTC CAATTCTTCT TTTATGACAT TC

32

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique codant pour une sous-unité de la topoisomérase IV de Staphylococcus aureus.
2. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :
 - 5 (a) tout ou partie des gènes grlA (SEQ ID N° 2) ou grlB (SEQ ID N° 3),
 - (b) les séquences hybridant avec tout ou partie des gènes (a) et codant pour une sous-unité d'une topoisomérase IV et,
 - (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.
- 10 3. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du gène grlA (SEQ ID N° 2).
4. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du gène grlB (SEQ ID N° 3).
5. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du gène grlA possédant une mutation conduisant à une résistance à l'égard de molécules de la famille des quinolones.
- 15 6. Séquence nucléotidique selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'il s'agit du gène grlA possédant une base A en substitution d'une base C en position 2270 de la SEQ ID N°2.
- 20 7. ADN recombinant comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 6.
8. Vecteur d'expression à répllication autonome et/ou intégratif caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 6.
9. Cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 6, un ADN recombinant selon la revendication 7 et/ou un vecteur d'expression selon la revendication 8.
- 25 10. Cellule selon la revendication 8 caractérisée en ce qu'il s'agit de préférence d'une bactérie.

11. Polypeptide résultant de l'expression d'au moins une séquence selon l'une des revendications 1 à 6.

12. Polypeptide comprenant tout ou partie du polypeptide GrlA (SEQ ID N° 2), du polypeptide GrlB (SEQ ID N° 3) ou d'un dérivé de ceux-ci.

5 13. Polypeptide selon la revendication 11 ou 12 caractérisé en ce qu'il s'agit du polypeptide GrlA (SEQ ID N° 2).

14. Polypeptide selon la revendication 11 ou 12 caractérisé en ce qu'il s'agit du polypeptide GrlB (SEQ ID N° 3).

10 15. Polypeptide selon la revendication 11 ou 12 caractérisé en ce qu'il s'agit du polypeptide GrlA(Ser-80→Tyr).

16. Procédé de production d'un polypeptide selon l'une des revendications 11 à 15 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon la revendication 9 ou 10 et l'on récupère le polypeptide produit.

15 17. Topoisomérase IV isolée caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue à partir de l'expression de tout ou partie du gène grlA (SEQ ID n° 2) et de tout ou partie du gène grlB (SEQ ID n° 3), ou de leurs dérivés respectifs tels que définis en b) et c) de la revendication 2.

20 18. Topoisomérase IV isolée selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est issue de l'expression de tout ou partie du gène grlA (SEQ ID n° 2) et de tout ou partie du gène grlB (SEQ ID n° 3).

25 19. Topoisomérase IV isolée caractérisée en ce qu'elle possède un comportement de cible primaire à l'égard des fluoroquinolones.

20 20. Topoisomérase IV isolée selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'il s'agit de la topoisomérase IV de Staphylococcus aureus.

30 21. Utilisation d'une topoisomérase IV selon l'une des revendications 17 à 20 pour cribler des produits biologiquement actifs.

22. Utilisation d'une topoisomérase IV selon l'une des revendications 17 à 20 pour rechercher des produits inhibiteurs de la réaction de relaxation ATP dépendante de l'ADN.

- 5 23. Utilisation d'une topoisomérase IV selon l'une des revendications 17 à 20 pour identifier des produits inhibiteurs de la réaction de décatanation des caténanes d'ADN.

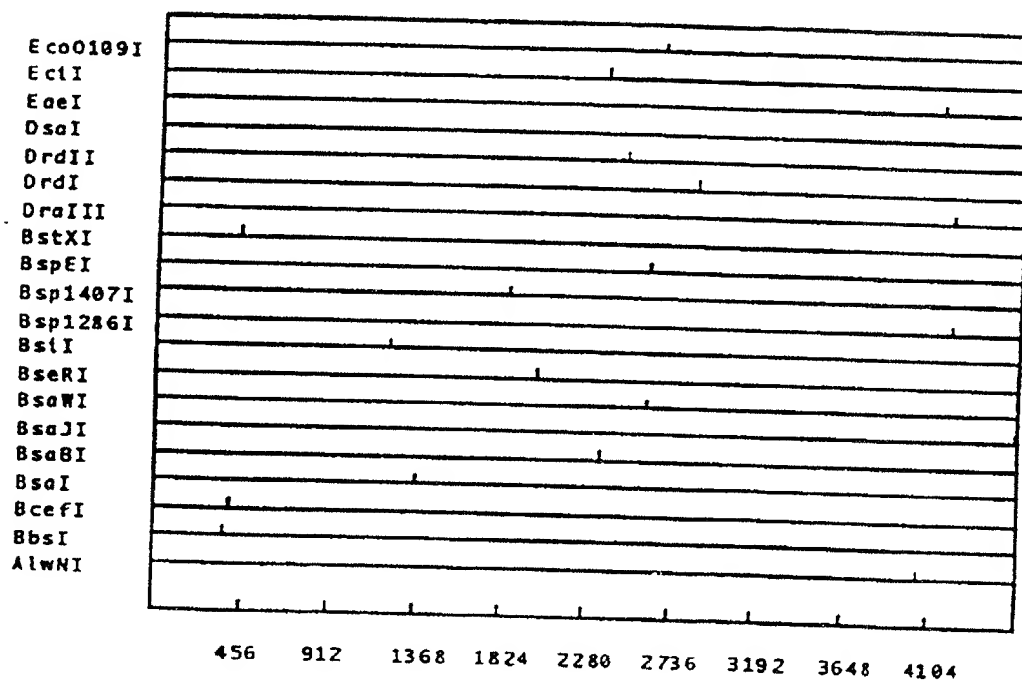
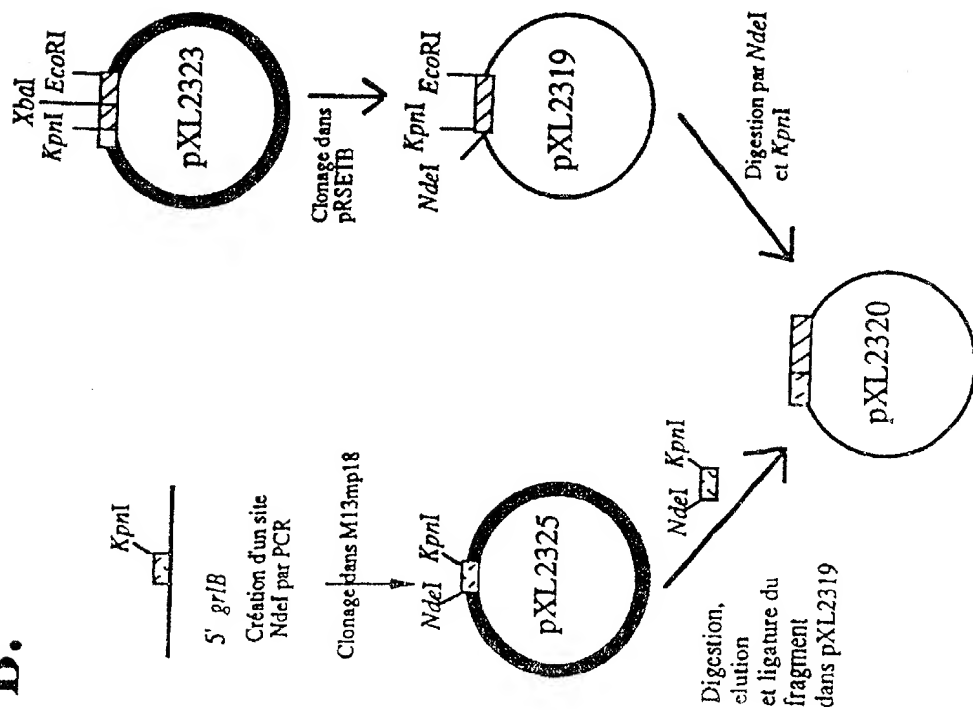
Carte de restriction de la séquence grlBA de 1 à 4565

Figure 1

2/5

B.



Construction des plasmides d'expression *grlB* et *grlA*

Figure 2

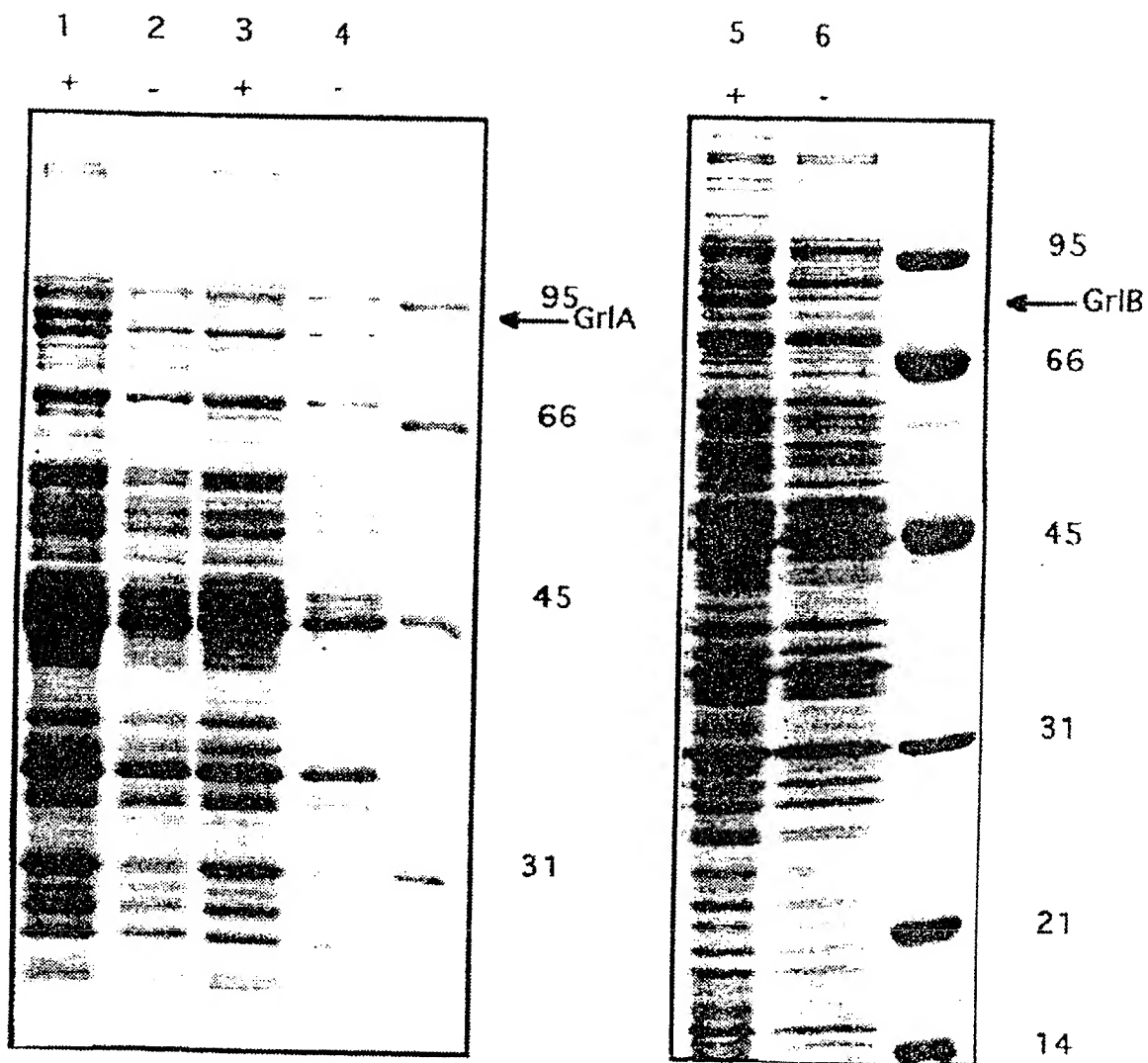


Figure 3

4/5

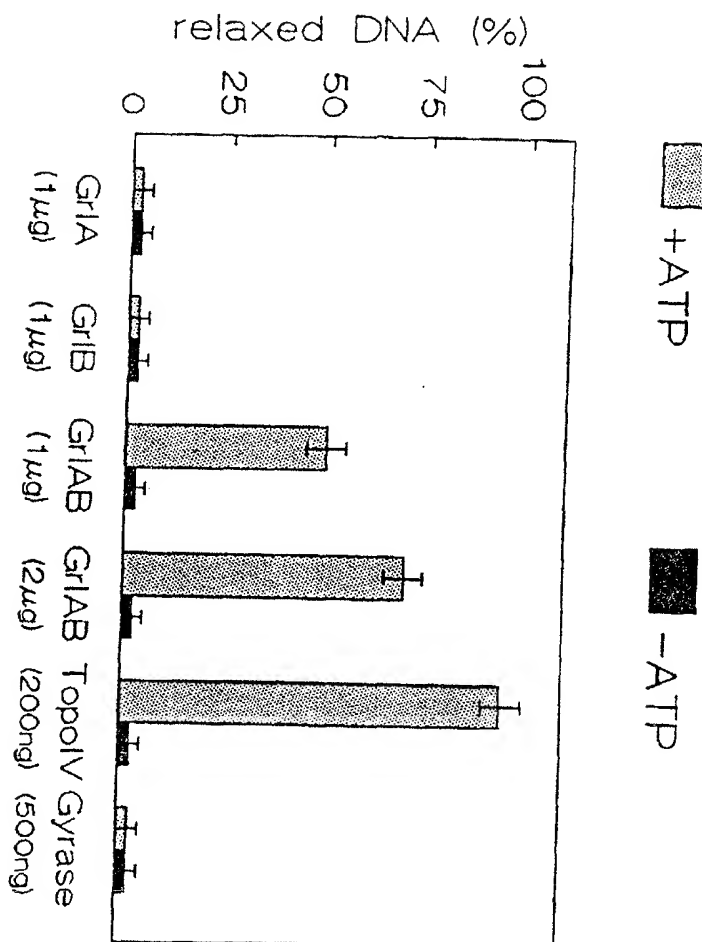


Figure 4

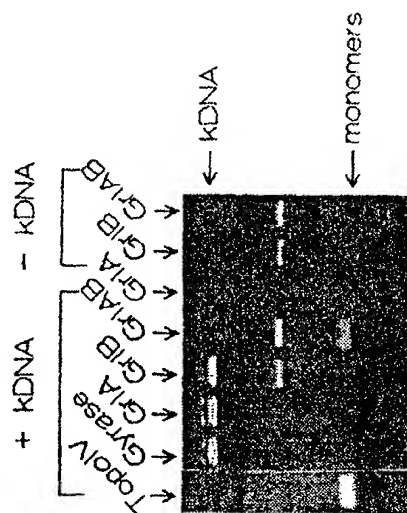


Figure 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01001

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. BACTERIOL., vol. 172, no. 12, December 1990 AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US;; pages 7260-7267, S. SREEDHARAN ET AL. 'DNA gyrase gyrA mutations in Ciprofloxacin-resistant strains of Staphylococcus aureus: Close similarity with quinolone resistance mutations in Escherichia coli' cited in the application see the whole document ---	1-23
A	J. BIOL. CHEM., vol. 268, no. 32, 15 November 1993 AM. SOC. BIOCHEM. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US;; pages 24481-24490, H. PENG AND K.J. MARIANS 'Escherichia coli topoisomerase IV' cited in the application see the whole document ---	1-23
A	PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 90, no. 18, 15 September 1993 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US;; pages 8571-8575, H. PENG AND K.J. MARIANS 'Decatenation activity of topoisomerase IV during oriC and pBR322 DNA replication' cited in the application see the whole document ---	1-23
A	J. BIOL. CHEM., vol. 267, no. 36, 25 December 1992 AM. SOC. BIOCHEM. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US, pages 25676-25684, J. KATO ET AL. 'Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in Escherichia coli' cited in the application see the whole document ---	1-23
P,X	MOLECULAR MICROBIOLOGY 13 (4). 1994. 641-653. ISSN: 0950-382X, August 1994 FERRERO L ET AL 'Cloning and primary structure of Staphylococcus aureus DNA topoisomerase: IV. A primary target of fluoroquinolones.' see the whole document ---	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/61 C12N9/90 C12N1/21 C12Q1/68 C12Q1/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. BACTERIOL., vol. 172, no. 6, June 1990 AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US;, pages 3481-3484, see the whole document ---	1-23
A	J. BACTERIOL., vol. 174, no. 5, March 1992 AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US;, pages 1596-1603, E.E.C. MARGERRISON ET AL. 'Nucleotide sequence of the Staphylococcus aureus gyrB-gyrA locus encoding the DNA gyrase A and B proteins' cited in the application see the whole document --- -/--	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 1995

Date of mailing of the international search report

24. 11. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 95/01001

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 39 (7). 1995. 1554-1558. ISSN: 0066-4804, July 1995</p> <p>FERRERO L ET AL 'Analysis of gyrA and grlA Mutations in Stepwise-Selected Ciprofloxacin-Resistant Mutants of Staphylococcus aureus.'</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p>	1-20
T	<p>95TH GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, D.C., USA, MAY 21-25, 1995. ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 95 (0). 1995. 159. ISSN: 1060-2011,</p> <p>NG E Y ET AL 'Novel mutations in topoisomerase IV (Topo4) in quinolone-resistant (QR) flqA mutants and their interaction with QR gyrA mutations in Staphylococcus aureus.'</p> <p>see abstract</p> <p>-----</p>	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Requête Internationale No

PCT/FR 95/01001

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/61 C12N9/90 C12N1/21 C12Q1/68 C12Q1/533

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	J. BACTERIOL., vol. 172, no. 6, Juin 1990 AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US;, pages 3481-3484, voir le document en entier ---	1-23
A	J. BACTERIOL., vol. 174, no. 5, Mars 1992 AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US;, pages 1596-1603, E.E.C. MARGERRISON ET AL. 'Nucleotide sequence of the Staphylococcus aureus gyrB-gyrA locus encoding the DNA gyrase A and B proteins' cité dans la demande voir le document en entier --- -/-	1-23

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 Novembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24.11.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hornig, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

— demande internationale No
PCT/FR 95/01001

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	J. BACTERIOL., vol. 172, no. 12, Décembre 1990 AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US;, pages 7260-7267, S. SREEDHARAN ET AL. 'DNA gyrase gyrA mutations in Ciprofloxacin-resistant strains of Staphylococcus aureus: Close similarity with quinolone resistance mutations in Escherichia coli' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
A	J. BIOL. CHEM., vol. 268, no. 32, 15 Novembre 1993 AM. SOC. BIOCHEM. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US;, pages 24481-24490, H. PENG AND K.J. MARIANS 'Escherichia coli topoisomerase IV' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
A	PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 90, no. 18, 15 Septembre 1993 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 8571-8575, H. PENG AND K.J. MARIANS 'Decatenation activity of topoisomerase IV during oriC and pBR322 DNA replication' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
A	J. BIOL. CHEM., vol. 267, no. 36, 25 Décembre 1992 AM. SOC. BIOCHEM. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US, pages 25676-25684, J. KATO ET AL. 'Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in Escherichia coli' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
P, X	MOLECULAR MICROBIOLOGY 13 (4). 1994. 641-653. ISSN: 0950-382X, Août 1994 FERRERO L ET AL 'Cloning and primary structure of Staphylococcus aureus DNA topoisomerase: IV. A primary target of fluoroquinolones.' voir le document en entier ---	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

L. demande internationale No

PCT/FR 95/01001

C.(state) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 39 (7). 1995. 1554-1558. ISSN: 0066-4804, Juillet 1995</p> <p>FERRERO L ET AL 'Analysis of gyrA and grlA Mutations in Stepwise-Selected Ciprofloxacin-Resistant Mutants of Staphylococcus aureus.'</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-20
T	<p>95TH GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, D.C., USA, MAY 21-25, 1995. ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 95 (0). 1995. 159. ISSN: 1060-2011,</p> <p>NG E Y ET AL 'Novel mutations in topoisomerase IV (Topo4) in quinolone-resistant (QR) flqA mutants and their interaction with QR gyrA mutations in Staphylococcus aureus.'</p> <p>voir abrégé</p> <p>-----</p>	1-20